

ANA LUIZA PEREIRA MARTINS

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA FLOR DE *Dianthus caryophyllus* SOBRE OS  
TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS**

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

M379e  
2018  
Martins, Ana Luiza Pereira, 1992-  
Efeitos do extrato aquoso da flor de *Dianthus caryophyllus*  
sobre os testículos de camundongos adultos / Ana Luiza Pereira  
Martins. – Viçosa, MG, 2018.  
vi, 40f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.30-40.

1. Túbulo seminífero. 2. Reprodução animal. 3.  
Espermatogênese em animais. 4. Extratos vegetais. 5. *Dianthus  
caryophyllus*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural. II. Título.

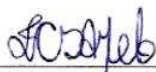
CDD 22 ed. 599.35

ANA LUIZA PEREIRA MARTINS

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA FLOR DE *Dianthus caryophyllus* SOBRE OS TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS**

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: 28 de fevereiro de 2018.



Fabiana Cristina S. Alves de Melo



Sirlene Souza Rodrigues Sartori



Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, e por todas as graças que já me concedeu até agora.

Aos meus pais, meu irmão, minha avó e minha tia pelas orações, força, apoio, amor e confiança que sempre depositaram em mim, em especial a minha avó que além de tudo é minha inspiração.

Ao Lucas pela paciência e companheirismo desde a graduação.

A minha querida amiga da graduação Ana Carolina pela parceria, conversas intermináveis e momentos de diversão.

Aos meus professores da graduação e do mestrado por todo conhecimento que adquiri com ajuda deles.

Aos amigos feitos no laboratório, aos que já foram e aos que ainda estão por aqui, pelo afeto e momentos de descontração. Em especial as integrantes da Liga do 333 por toda força, empenho e mão de obra.

A Lidiane e Jerusa pela disponibilidade e zelo que mesmo de longe me ajudaram muito.

Ao meu orientador Sérgio pela paciência, atenção, carinho, pelo cuidado e por tudo que já aprendi até aqui, e claro pelo café sempre disponível.

As professoras Fabiana e Sirlene por aceitarem a participar da minha banca, e pelas contribuições que serão feitas.

Aos laboratórios de Associações de Micorrizas e Sistemática Molecular de Peixes por cederem o fotomicroscópio para obtenção das imagens. Ao técnico Monteiro do DZO que me auxiliou na liofilização do extrato. E ao Luiz Trevisan por ter concedido o material vegetal para o experimento.

A CAPES pela bolsa concedida.

E a cidade de Viçosa que eu adoro, e a Universidade por terem sido palco do meu crescimento.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1. OBJETIVOS.....	2
1.1 Objetivo geral .....	2
1.2 Objetivos específicos .....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Fitoterapia.....	3
2.2 Plantas usadas para fins reprodutivos.....	3
3.3. <i>Dianthus caryophyllus</i> .....	5
2.3 Testículo .....	6
2.4 Espermatogênese .....	7
2.5 Células de Sertoli.....	8
2.6 Célula de Leydig.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1 Obtenção do extrato vegetal.....	10
3.2 Tratamento .....	11
3.3 Coleta das amostras e biometrias corporal e testicular .....	11
3.4 Microscopia de luz.....	12
3.5 Análises estereológicas e morfometria tubular .....	12
3.6 Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero .....	13
3.7 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo .....	13
3.8 Área tubular, luminal, epitelial e relação túbulo/epitélio.....	13
3.9 Análise histopatológica tubular.....	13
3.10 Análise morfométrica intertubular .....	14
3.10.1 <i>Proporções volumétricas e volume dos componentes intertubulares</i> .....	14
3.10.2 <i>Diâmetro nuclear, volumes nuclear, citoplasmático e da célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo</i> .....	14
3.10.3 <i>Índice Leydigossomático</i> .....	15
3.11 Estresse oxidativo .....	15
3.11.1 <i>Análises das enzimas antioxidantes</i> .....	15
3.11.2 <i>Óxido nítrico (ON)</i> .....	16

3.11.3	<i>Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA)</i> .....	16
4.	Resultados .....	17
5.	Discussão.....	27
6.	Conclusões .....	30
7.	Referências bibliográficas .....	30

## RESUMO

MARTINS, Ana Luiza Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Efeitos do extrato aquoso da flor de *Dianthus caryophyllus* sobre os testículos de camundongos adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Plantas medicinais dominam a farmacologia por proverem várias fontes de remédios e assim, a mesma espécie de planta pode ter compostos que melhoram e compostos que prejudicam a espermatogênese. *Dianthus caryophyllus* apresenta ação antibiótica, antifúngica, antiviral, antioxidativa, sedativa e tranquilizante. Teve ação no controle da pressão arterial em ratos e possível efeito antiurótico, porém nenhum estudo foi feito para avaliar seus efeitos na reprodução. Assim, esse estudo visou avaliar o efeito do extrato aquoso da flor de *Dianthus caryophyllus* (EADC) nos testículos de camundongos Balb/c, além da resposta de enzimas antioxidante à planta. Quarenta e oito animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais (n=8): G1 (Controle), G2 (Viagra), G3, G4, G5 receberam diariamente 10, 20, 40 mg/kg de EADC, respectivamente, e o G6 recebeu EADC 40mg/kg em dias alternados. Foram realizadas análises morfométricas e estereológicas do parênquima testicular, avaliação de alterações estruturais do tecido, atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST), além da concentração de malondialdeído (MDA) e de óxido nítrico (ON) nos testículos. Houve redução do diâmetro, proporção, volume e área do lúmen tubular, aumento da proporção e área de epitélio seminífero em todos os grupos tratados com a planta, sendo que o diâmetro tubular reduziu apenas em G5. Houve redução da proporção de túbulos seminíferos normais e aumento de vacúolos em todos os grupos. No intertúbulo houve aumento de tecido conjuntivo em G5. A proporção de células de Leydig aumentou apenas em G6, assim como o volume das células de Leydig por grama de testículo no mesmo grupo. O número de células de Leydig por testículo aumentou apenas em G6, enquanto por grama de testículo houve aumento em G5 e G6. Quanto à volumetria dos componentes, houve aumento do volume de tecido conjuntivo em G4, G5 e G6. Houve aumento de CAT em G5 e G6 e de MDA em todos os grupos tratados. Pode-se inferir que houve aumento da produção espermática em todos os grupos, no intertúbulo nota-se mais efeitos em Leydig e tecido conjuntivo principalmente nos grupos G5 e G6 e que a planta gera estresse oxidativo.

## ABSTRACT

MARTINS, Ana Luiza Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Effects of aqueous extract of *Dianthus caryophyllus* flower on the testes of adult mice.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Medicinal plants dominate pharmacology by providing various sources of medicines and thus, the same plant species may have components that improve and impair spermatogenesis. *Dianthus caryophyllus* has antibiotic, antifungal, antiviral, antioxidative, sedative and tranquilizing actions. It had action in controlling blood pressure in rats and possible antiurolithic effects, but no study was done to evaluate its effects on reproduction. The aim of this study was evaluate the effect of the aqueous extract of the *Dianthus caryophyllus* flowers (AEDC) on the testis of Balb/c mice and the antioxidant enzyme response to the plant. 48 animals were randomly distributed in six experimental groups (n = 8): G1 (Control), G2 (Viagra), G3, G4, G5 received daily 10, 20, 40 mg / kg AEDC respectively and G6 40 G / AEDC 40mg / kg every other day. Morphometric and stereological analyzes of the testicular parenchyma, evaluation of tissue structural alterations, activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST), and malondialdehyde (MDA) and oxide nitric oxide (ON) in the testicles. There was a reduction in the diameter, proportion, volume and area of the tubular lumen, increase in the proportion and area of seminiferous epithelium in all groups treated with the plant, and reduction of tubular diameter only in G5. There was a reduction in the proportion of normal seminiferous tubules and increase of vacuoles in all groups. In the intertubular compartment there was reduction in the proportion of lymphatic space as well as increase of connective tissue in all the treated groups. The proportion of Leydig cells increased only in G6, as did the volume of Leydig cells per gram of testis in the same group. The number of Leydig cells per testis increased only in G5, while per gram of testis there was increase in G5 and G6. In the volumetry of the components, there was an increase of only connective tissue in G4, G5 and G6. There was an increase in CAT in G5 and G6 and in MDA in all treated groups. It can be concluded that there was an increase in sperm production in all groups, in the intertubular compartment there were more effects in Leydig and connective tissue, especially in the G5 and G6 groups, and that the plant generates oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Compostos químicos derivados de animais, plantas e microrganismos são usados para tratar doenças desde os primórdios da medicina. Desde então, produtos derivados de plantas dominam a farmacologia por proverem várias fontes de remédios. Plantas medicinais têm sua composição complexa, sendo essa uma vantagem, pois seus compostos têm múltiplas atividades que resultam numa atividade total maior. A Organização Mundial da Saúde estima que 70-90% da população mundial use a medicina tradicional para cuidados primários assim como uso de extratos de plantas ou seus compostos ativos (CARMONA e PEREIRA, 2013).

Várias plantas têm propriedades antagonistas com efeitos na espermatogênese, aumentando ou reduzindo o número de espermatozoides. Assim, a mesma espécie de planta pode ter compostos que melhoram e compostos que prejudicam a espermatogênese. Antocianinas e o ácido ascórbico, presentes em várias plantas, foram associados ao aumento da densidade das células espermatogênicas, reduzindo a apoptose e marcadores de estresse oxidativo (GONZALEZ et al., 2013). Por outro lado, compostos como canabidiol e vincristina mostraram ter ação negativa às defesas antioxidantes e redução do número de células no epitélio germinativo, respectivamente (D'CRUZ et al., 2010).

A família Caryophyllaceae é uma das maiores famílias de dicotiledôneas entre as angiospermas, com 85 gêneros e 2630 espécies atualmente descritas. As plantas dessa família estão presentes no hemisfério norte, mais concentradas na área do mediterrâneo. *Dianthus caryophyllus* apresenta ação antibiótica, antifúngica (BONJAR et al., 2004) e antiviral (CHANDRA e RAWAT, 2015), sendo usada como sedativo (ALBUQUERQUE, 2001) e tranquilizante (DARIAS, 1989). Além disto, teve ação no controle da pressão arterial em ratos e no tratamento de doença do trato urinário inferior (DITUIF) em gatos, sendo um possível antirolítico (TREVISAN et al., 2016) mostrando sua ação no tecido muscular liso, por isso questionou-se seu efeito no sistema reprodutor masculino por serem tecidos vascularizados e compostos por músculo liso. A espécie é rica no flavonoide kaempferol que foi usado como fitoestrógeno em células cancerígenas do cólon, possuindo também outros flavonoides e isoflavonoides com ações antioxidantes já testados em experimentos *in vitro* (MARTINETI et al., 2010). Porém não há estudos sobre a ação de *D. caryophyllus* na espermatogênese.

O presente estudo visou avaliar o efeito do extrato aquoso da *Dianthus caryophyllus* sobre parâmetros histomorfométricos nos testículos de camundongos Balb/c, além da resposta antioxidante testicular.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de doses crescentes de modo contínuo e descontínuo do extrato aquoso da flor de *Dianthus caryophyllus* nos testículos de camundongos adultos.

### 1.2 Objetivos específicos

- Obter valores biométricos corporais e testiculares;
- Determinar a proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e intertubulares;
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES), Leydigossomático (ILS);
- Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos e o comprimento total de túbulo por grama de testículo;
- Calcular a área tubular, luminal e epitelial;
- Avaliar as alterações estruturais do compartimento tubular;
- Mensurar o diâmetro, volume nuclear e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST) nos testículos;
- Mensurar a concentração de óxido nítrico (ON) e malondialdeído (MDA) nos testículos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Fitoterapia**

Fitoterapia é a prática da aplicação terapêutica de plantas, inteiras ou em parte, ou ainda de seus compostos. O primeiro registro dessa prática está no Divine Farmer's Classic of Herbalism, há mais de 2800 anos, pelo autor chinês Shen Nong. Embora o uso medicinal do salgueiro *Salix* sp. seja de 6000 anos atrás, foi apenas em 1897 que a primeira droga sintética, a aspirina, foi criada a partir do ácido salicílico (CARMONA e PEREIRA, 2013). A ingestão de produtos vegetais tem duas vertentes: a primeira é holística, na qual o efeito da planta seria observado no organismo como um todo; e a segunda, mais científica, é voltada para o efeito das plantas nos sintomas além da pesquisa de suas moléculas ativas (LACCOURREYE et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, na China, 30 a 50% dos medicamentos consumidos são de origem vegetal. Na Europa e América do Norte, 50% da população faz uso de fitoterápicos, enquanto na Alemanha a proporção é de 90%, e no Brasil as estimativas chegam a 83%. Assim, o Ministério da Saúde implantou a fitoterapia como prática da medicina e a incluiu nos serviços básicos de saúde. Também ficou condicionado o uso de plantas medicinais em estudos científicos junto à medicina popular, assim como o isolamento e caracterização dos compostos ativos das plantas (OLIVEIRA et al., 2010).

Cerca de 120 compostos têm suas estruturas químicas definidas, caracterizadas apenas de 94 espécies de vegetais usadas como drogas (FABRICANT e FARNSWORTH, 2001). A flora brasileira é rica em plantas com potencial medicinal, porém poucos são os dados científicos que descrevem essas espécies, apesar de ser crescente o número de pesquisas e investimentos no desenvolvimento de medicamentos derivados de plantas medicinais (FERREIRA, 1998).

A falta de conhecimento sobre as propriedades das plantas medicinais, de seus efeitos terapêuticos, farmacológicos bem como dos efeitos colaterais e tóxicos dificulta, em parte, a aceitação da população em optar pelo uso de fitoterápicos. Por isso a importância de estudos rigorosos para a comprovação da eficácia dessas plantas (GOMES, 2007; CARMONA et al., 2013).

### **2.2 Plantas usadas para fins reprodutivos**

Medicamentos à base de plantas são usados pela população masculina como afrodisíacos para tratamento de disfunção erétil e hiperplasia prostática benigna. Um dos

motivos do uso é a origem natural porque a maioria dos usuários acredita que as plantas medicinais são seguras, uma vez que medicamentos alopáticos como Viagra, Alprostadil, Ciproetadina e Buspirona, geralmente receitados para o tratamento de disfunção erétil, exibem efeitos colaterais. Porém, casos de toxicidade podem ser atribuídos mais ao uso indiscriminado de plantas medicinais do que a fármacos tradicionais. No entanto, faltam comprovações científicas dos efeitos das plantas bem como de sua segurança e qualidade (BUTTAR e JONES, 2003). Neste sentido, vários estudos foram realizados com plantas medicinais para averiguar seus efeitos em parâmetros reprodutivos (Tabela 1).

Tabela 1: Plantas medicinais e suas utilizações.

<b>Espécie</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Uso medicinal</b>	<b>Referências</b>
<i>Bersama stayneri</i>	Casca	Usada contra impotência.	HUTCHINGS et al.(1996)
<i>Bridelia catártica</i>	Raiz	Usada em casos de esterilidade.	GELFAND et al.(1985)
<i>Capparis tomentosa</i>	Raiz	Usada contra impotência.	HUTCHINGS et al.(1996)
<i>Carissa edulis</i>	Raiz	Usada como afrodisíaco.	MABOGO (1990), OMINO E KOKWARO (1993)
<i>Clerodendrum myricoides</i>	Raiz	Usada contra esterilidade e impotência.	HUTCHINGS et al.(1996)
<i>Elephantorrhiza cordatum</i>	Raiz	Usada contra impotência.	HULME (1954), BRYANT (1966)
<i>Euphorbia tirucalli</i>	Látex	Usada contra impotência.	WATT E BREYER-BRANDWIJK (1962)
<i>Garcinia livingstonei</i>	Raiz	Usada como afrodisíaco.	MABOGO (1990), POOLEY (1993)
<i>Gloriosa superba</i>	Semente	Usada contra impotência.	BRYANT (1966), HUTCHINGS et al.(1996)
<i>Grewia microthyrsa</i>	Raiz	Aumento da fertilidade.	MABOGO (1990), CORRIGAN et al.(2011)
<i>Rhoicissus tridentata</i>	Raiz e casca	Usada contra disfunção erétil.	MABOGO (1990), RAKUAMBO et al.(2006)
<i>Securidaca longepedunculata</i>	Raiz	Usada contra impotência.	ARNOLD E GULUMIAN (1984), MABOGO (1990), VAN WYK E GERICKE (2000)
<i>Vitellariopsis marginata</i>	Raiz	Usada como estimulante sexual.	HUTCHINGS et al.(1996)

### 3.3. *Dianthus caryophyllus*

A espécie *Dianthus caryophyllus* pertence à família Caryophyllaceae. Várias plantas dessa família possuem amplo uso na medicina tradicional, principalmente na medicina chinesa e são popularmente conhecidas como cravos. Além de propriedades antifúngicas, antibacterianas, antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer, estudos mostraram sua ação atenuante na hiperplasia prostática e obesidade em ratos, além de atividade protetora ao cérebro. Das 2630 espécies da família, cerca de 50 a 90 espécies são conhecidas por suas propriedades medicinais, podendo ser eretas ou prostradas, anuais ou perenes, ervas ou pequenos arbustos, sendo muito usadas em ornamentações (CHANDRA e RAWAT, 2015).

*D. caryophyllus* mostrou ação antibiótica considerável contra várias bactérias gram positivas e negativas (BONJAR, 2004), dentre elas a *Pseudomonas aeruginosa*, que acomete feridas e queimaduras e a *Pseudomonas fluorescens* que é responsável por infecções no sistema respiratório e urinário (TERAHARA et al., 1984).

O flavonoide kaempferol encontrado na planta tem mostrado atividade antifúngica em alguns alimentos, impedindo o desenvolvimento de micelas, apresentando também ação antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida utilis* e *Sacharomyces cerevisiae* (BONJAR e KARIMI, 2004; GALEOTTI et al., 2008a). O mesmo flavonoide foi usado como fitoestrógeno em células cancerígenas do colón e comprovou-se a inibição do crescimento celular *in vitro* e aumento do o tempo nas fases de G0/G1 dessas células (MARTINETI et al., 2010).

Em ratos Wistar com hipertensão experimental, o extrato hidroalcoólico de *D. caryophyllus* reduziu a pressão arterial dos animais (PINA et al., 2009). Este extrato também foi usado como protocolo de tratamento alternativo contra DITUIF em gatos possibilitando a eliminação dos cálculos renais e a recuperação da integridade do sistema urinário, tendo suposto efeito antiurolítico (TREVISAN et al., 2016). O óleo essencial da planta apresentou moderada ação contra a larva do mosquito *Culex pipiens*, em parte pela presença do eugenol no óleo (KIMBARIS et al., 2012). *D. caryophyllus* apresentou também ação antiviral suprimindo lesões do vírus do mosaico em tabaco, além da semente agir contra o vírus do herpes HSV-1. Duas saponinas presentes na parte aérea da planta mostraram ação analgésica e anti-inflamatória (CHANDRA e RAWAT, 2015).

A infusão de *D. caryophyllus* é usada na Bolívia para tratamento de catarata, epilepsia e asma (FERNANDEZ et al., 2003). É utilizada ainda em tratamento de feridas, infecção de garganta, desordens gastrointestinais (MOHAMMED e AL-BAYATI, 2009), tendo sido

usada como tranquilizante (DARIAS et al., 1989) e sedativo nas Ilhas Canárias (ALBUQUERQUE, 2001).

Galeotti et al.(2008b) mostraram que as flores de *D. caryophyllus* são ricas em duas variações dos flavonoides kaempferol e uma da apigenina. Os flavonoides são metabólitos secundários responsáveis pela variedade farmacológica das plantas e que têm suas atividades dependentes da sua estrutura. Dentre as várias propriedades bioquímicas a melhor descrita é a antioxidante, graças aos grupos funcionais ligados aos anéis, principalmente o grupo hidroxila (KUMAR e PANDEY, 2013).

### **2.3 Testículo**

Os testículos são órgãos pares localizados no escroto, que se comunicam com a cavidade abdominal através do canal inguinal. São envoltos externamente pela túnica vaginal e internamente pela albugínea testicular que emite septos para o interior do parênquima formando os lóbulos (HEDRISH e BULLOCK, 2004).

Essencialmente o testículo possui duas funções: produzir espermatozoides e sintetizar esteroides. Cada lóbulo é composto por túbulos seminíferos e pelo espaço intersticial, denominado também de intertúbulo. Os túbulos seminíferos que constituem o compartimento tubular, são estruturas enoveladas cuja as duas extremidades chegam à rede testicular onde as células são especializadas em endocitose de proteínas e moléculas transportadas no interior do lume dos túbulos seminíferos. Estes constituem a maior parte do testículo ocupando cerca de 70 a 90% do parênquima testicular (FRANÇA e RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999; HERMO et al., 2010).

O epitélio seminífero reveste os túbulos seminíferos interiormente, sendo composto por células germinativas e células de Sertoli que desempenham várias funções na espermatogênese, dentre elas suporte e nutrição para as células germinativas. Os túbulos seminíferos são delimitados pela túnica própria constituída de células mioides, além de fibras colágenas, elásticas e a membrana basal. A contração das células mioides é responsável pela condução dos espermatozoides imaturos pelo lume até a rede testicular (RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010).

O testículo humano possui de 200 a 300 lóbulos e em cada um há apenas um túbulo seminífero que chega a medir de 70 a 80 cm de comprimento. O comprimento total dos túbulos seminíferos no testículo humano varia de 450 a 650 metros. Em camundongos, o

testículo possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos e o comprimento tubular total é cerca de 2 metros por gônada (BASCOM e OSTERUD, 1925; KERR et al., 2006).

O tecido intersticial ou intertúbulo ocupa os espaços entre os túbulos seminíferos no parênquima testicular e contém estruturas essenciais para o funcionamento gonadal. Possui pequenos vasos e capilares que trazem e levam metabólitos e hormônios. Contém as células de Leydig que sintetizam e secretam hormônios, além de possuir células do tecido conjuntivo como fibroblastos e macrófagos, vasos linfáticos e nervos (HERMO et al 2010; JONES e LOPEZ, 2014).

## **2.4 Espermatogênese**

Espermatogênese é o processo de diferenciação das espermatogônias (diploides) em espermatozoides (haploides) que dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos. Envolve divisão mitótica e meiótica e remodelação celular, distribuída em três fases: a primeira é a fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas divisões mitóticas; a segunda é a fase meiótica ou espermatocitogênica, onde o material genético é recombinado e segregado e a terceira fase é a espermiogênese, na qual as espermátides sofrem modificações morfológicas, resultando na formação dos espermatozoides (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994; SHARMA e AGARWAL, 2011).

De acordo com Huckins (1971) as espermatogônias possuem três classes: as tronco, as proliferativas e as diferenciadas. As espermatogônias B, se diferenciam em espermatócitos primários, sendo eles a entrarem na prófase I da meiose como preleptóteno. A prófase I leva 90% do tempo da meiose completa, sendo possível observar o rearranjo do material genético durante suas fases. Ao final da meiose I é formado o espermatócito secundário que segue na segunda divisão da meiose. Esta divisão acontece rapidamente, por isso o espermatócito secundário é pouco observado em preparações histológicas. Por fim, são formadas as espermátides, que são células haploides. Na última fase, ocorre a espermiogênese, onde haverá a condensação do material genético, perda de parte do citoplasma das espermátides, formação do flagelo e do acrossoma, culminando na formação dos espermatozoides (RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010).

O epitélio seminífero apresenta células germinativas em arranjo concêntrico entremeadado pelas células de Sertoli, as quais são as únicas células somáticas dentro dos túbulos. As células de Sertoli promovem o ambiente favorável para a espermatogênese ao desempenhar várias funções, dentre elas: suporte e nutrição das células germinativas;

compartimentalização do epitélio seminífero por meio das junções de oclusão, formando um ambiente especializado para o desenvolvimento das células; esta célula controle da liberação dos espermatozoides no lume do túbulo, secreção de proteínas e fatores de crescimento, fagocitose dos corpos residuais, além de mediação a ação do FSH (Hormônio folículo estimulante) e LH (Hormônio luteinizante) na espermatogênese (HESS e FRANÇA, 2009).

## 2.5 Células de Sertoli

A proliferação das células de Sertoli em ratos tem início no décimo sexto dia de vida fetal e dura até o segundo dia após o nascimento. Elas são aproximadamente um milhão ao nascimento e atingem 40 milhões até o décimo quinto dia após o nascimento, após isso elas começam a se diferenciar. A proliferação das células de Sertoli é controlada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e fatores intracelulares, enquanto que os hormônios da tireoide promovem a diferenciação das células na fase neonatal (O'DONNELL et al., 2001).

A célula de Sertoli tem o formato colunar e estende-se da base do túbulo seminífero até o lume, envolve as células germinativas com seu citoplasma e forma junções de adesão e GAP entre elas. Seu volume médio é de  $6000\mu\text{m}^3$  e sua superfície cerca de  $12000\mu\text{m}^2$  e estima-se que 40% de sua superfície celular esteja em contato com as espermátides arredondadas (HESS e FRANÇA, 2005; CUPP e SKINNER, 2005).

Suas funções incluem proporcionar estrutura, suporte e nutrição para as células germinativas, fagocitose de corpos residuais e células germinativas que morreram durante a mitose, regulação da espermiogênese, produção de proteínas, como a ABP (Proteína Ligadora de Andrógeno), e hormônios como AMH (Hormônio Antimulleriano) e Inibina. A chave para promover o suporte para as células germinativas durante a espermatogênese se deve à barreira da célula de Sertoli composta principalmente pelas junções de oclusão entre duas células adjacentes. Essa barreira segrega as espermatogônias e espermátófitos na fase de preleptóteno no ambiente basal e o restante das células no ambiente adluminal, protegendo as células haplóides do reconhecimento do sistema imune. Além disto, foi comprovado que a barreira de Sertoli pode mudar sua composição possibilitando comunicação entre os dois ambientes durante a espermatogênese. Há um terceiro ambiente transitório que é formado durante a passagem do preleptóteno do ambiente basal para o adluminal (RUSSELL et al., 1990; JOHNSON et al., 2008; STANTON, 2016).

Recentemente foi comprovado que as células de Sertoli da região de transição entre os túbulos seminíferos e a rede testicular expressam fatores de proliferação e diferenciação até

120 dias após o nascimento em ratos, o que contrapõem a ideia que o número de células de Sertoli é fixo em animais adultos (FIGUEIREDO et al., 2016).

## 2.6 Célula de Leydig

As células de Leydig são notadas no décimo quinto dia de desenvolvimento embrionário em ratos. Essas células fetais secretam altas concentrações de andrógeno necessário para o desenvolvimento dos ductos de Wolf. No entanto a célula de Leydig fetal não é progenitora da célula adulta, apesar de estar presente em pouca quantidade em estado quiescente no testículo maduro. (O'DONNELL et al., 2001).

A testosterona é produzida pela célula de Leydig por estimulação do hormônio luteinizante (LH), que se difunde para dentro do túbulo seminífero e atua na espermatogênese. Na fase adulta, as células de Leydig são responsáveis pela produção de estrógenos através da P450 aromatase, e sintetiza também ocitocina que participa da contração das células mioides nos túbulos. Durante o desenvolvimento as células de Leydig produzem o fator semelhante à insulina-3 que participa na migração do testículo para a bolsa escrotal. A célula de Leydig também produz a diidrotestosterona, hormônio essencial para manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (GOYAL et al., 1999; GE et al., 2008).

## 2.7 Estresse oxidativo

Radical livre é todo átomo ou molécula que contenha um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, ou seja, um elétron que ocupa um orbital atômico isoladamente. Essa característica o torna altamente reativo, podendo reagir com outros componentes ou atingir estruturas celulares. Eles são formados pela perda ou ganho de um elétron de outra substância. Entre as espécies de radicais livres estão principalmente as derivadas de oxigênio e nitrogênio (VANNUCCHI et al., 1998).

O radical livre mais deletério ao organismo é a hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), ele é formado pela reação do peróxido de hidrogênio e causa danos no DNA, RNA, proteínas, lipídeos e membranas celulares. O radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) é inativo em meio aquoso, mas participa da produção do radical hidroxila, apesar de atuar na defesa do organismo contra infecções. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é gerado *in vivo* através do  $\text{O}_2^\cdot$ , e apesar de pouco reativo é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares e gerar o radical  $\text{OH}^\cdot$ . O radical óxido nítrico (ON) não causa dano celular sozinho, mas pode reagir com o radical superóxido e formar agentes capazes de alterar a estrutura de proteínas (BARREIROS e DAVID, 2006).

Nos organismos aeróbios, em situações fisiológicas, há equilíbrio entre espécies reativas que são geradas pelo metabolismo ou por condições patológicas com o sistema de defesa antioxidante, no entanto, quando há perda desse equilíbrio é gerado o estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Há três sistemas enzimáticos antioxidantes celulares. O primeiro é através da enzima Superóxido dismutase (SOD) que catalisa a eliminação de  $O_2^-$ , convertendo-o em água e oxigênio, mesmo que em pequenas concentrações. O segundo é através da enzima Catalase (CAT) que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. E o terceiro sistema é pela ação da enzima Glutathione (GSH) que catalisa a dismutação do  $H_2O_2$  em água e oxigênio. Existem antioxidantes biológicos como a bilirrubina, ubiquinona, carotenoides e ácido úrico, além da vitamina C (ANTUNES-NETO et al., 2005).

A produção de peróxidos e superóxidos de hidrogênio podem iniciar a peroxidação lipídica que é a formação de radicais de ácidos graxos. O malondialdeído (MDA) é um produto de oxidação lipídica sendo importante marcador de estresse oxidativo, por isso é quantificado para quantificar a peroxidação lipídica em amostras (JANERO, 1990; VANNUCCHI et al., 1998).

Em relação aos aspectos reprodutivos, o estresse oxidativo está relacionado à infertilidade masculina de 30% a 80% dos casos, isso porque os radicais livres danificam a membrana celular e o DNA dos espermatozoides, inviabilizando-os (TREMELLEN, 2008).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção do extrato vegetal**

As plantas foram cultivadas em Lavras (MG) no ano de 2016, sendo as flores separadas do restante da planta. As flores foram secas em estufa e enviadas para a Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para obtenção do extrato aquoso foram usados 140 gramas da flor, que foram turbolizadas em liquidificador na proporção de 1 litro de água para 20 gramas da flor. Em seguida o produto foi fervido por 30 minutos, evitando que a água entrasse em ebulição. Após a decocção, foram feitas três filtrações consecutivas em algodão e o líquido extraído foi liofilizado e macerado para obter o extrato em pó, o qual foi conservado em freezer durante o experimento.

### 3.2 Tratamento

Os procedimentos experimentais seguiram as determinações da Sociedade Brasileira e Ciência em Animais de Laboratório e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o protocolo 37/2017.

Foram utilizados 48 camundongos Balb/c machos em idade reprodutiva (60 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (20°C-22°C) e fotoperíodo de 12h claro/escuro, permanecendo em período de aclimatação por duas semanas. Foram oferecidos 10g de ração para cada animal diariamente e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais (n=8): G1 (Controle), G2 (Viagra), G3, G4, G5 que receberam diariamente o extrato aquoso da flor de *D. caryophyllus* (EADC), nas dosagens de 10, 20, 40 mg/kg respectivamente, e o G6 recebeu EADC 40mg/kg de modo descontínuo. Os animais foram pesados semanalmente e as doses ajustadas. Todo o tratamento foi administrado por gavagem e teve duração de 42 dias, que corresponde ao ciclo reprodutivo. Para escolha das dosagens foi seguido as usadas por Pina et al (2009) porém com modificações, a dose descontínua foi feita a fim de investigar a resposta fisiologia dos animais por doses fracionadas.

### 3.3 Coleta das amostras e biometrias corporal e testicular

Depois de 24h da última gavagem, os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se tiopental 30mg/kg, intraperitoneal. A eutanásia foi realizada através de punção cardíaca, sendo o sangue centrifugado e o plasma armazenado para análises posteriores. Em seguida, os testículos foram removidos e aqueles destinados às análises morfométricas foram fixados em solução de Karnovsky e aqueles destinados às análises bioquímicas foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C). Os testículos foram pesados após fixação em balança de precisão (BEL Mark 160/0,0001g).

Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular foi calculado o índice gonadossomático (IGS), a partir da equação:  $IGS (\%) = PG / PC \times 100$ , onde PG= Peso total das gônadas e PC= Peso corporal. Baseado nos pesos do parênquima testicular e corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS), a partir da equação:  $IPS (\%) = PP / PC \times 100$ , onde PP= Peso do parênquima dos dois testículos e PC= Peso corporal.

### 3.4 Microscopia de luz

Fragmentos de um dos testículos, destinado ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens dos túbulos seminíferos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o software de análise de imagens ImageJ.

### 3.5 Análises estereológicas e morfometria tubular

*Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular, volume dos componentes do túbulo, índices tubulossomático e epiteliossomático*

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 2.660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100X, realizando-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram anotados pontos sobre as estruturas do parênquima testicular, como túbulo seminífero, especificando-se aqueles sobre a túnica própria, o epitélio seminífero e lúmen, e sobre o intertúbulo. A proporção volumétrica tubular e dos componentes que compõe o túbulo foram calculadas utilizando-se a seguinte equação:  $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\text{NT} / \text{NTT}) \times 100$ , onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o túbulo ou componente e NTT= Número de pontos totais contados.

Para cálculo dos volumes de túbulo seminífero e seus componentes utilizou-se a equação:  $\text{Volume} = \% \text{ do elemento} \times \text{PPT} / 100$ , onde PPT= Peso do parênquima testicular.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da equação:  $\text{ITS} = \text{VTS} / \text{PC} \times 100$ , onde VTS= Volume de túbulo seminífero dos testículos e PC= Peso corporal. Baseado nos volumes de epitélios seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice epiteliossomático (IES) a partir da fórmula  $\text{IES} = \text{VES} / \text{PC} \times 100$ , onde VES= Volume de epitélio seminífero dos testículos e PC= Peso corporal.

O volume do testículo foi considerado igual ao peso, pois se entende que a densidade testicular está próxima de 1 em mamíferos (JOHNSON et al., 1981; COSTA et al., 2011).

### 3.6 Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio ( $\mu\text{m}$ ) por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, sem considerar o estágio do ciclo do epitélio seminífero. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ) a partir da túnica própria até o lúmen tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

### 3.7 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo

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, empregando-se a seguinte equação:  $\text{CTT} = \text{VTS} / \pi R^2$ , onde VTS= Volume total de túbulos seminíferos dos testículos,  $\pi R^2$ = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R= diâmetro tubular / 2.

O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da equação:  $\text{CTT/g} = \text{CTT} / \text{PG}$ , onde CTT= Comprimento total de túbulos seminíferos e PG= Peso das gônadas.

### 3.8 Área tubular, luminal, epitelial e relação túbulo/epitélio

A área tubular foi calculada pela fórmula  $\text{AT} = \pi \cdot \text{RT}^2$ , onde RT= raio tubular, enquanto a área luminal foi calculada pela fórmula  $\text{AL} = \pi \cdot \text{RL}^2$ , onde RL= área luminal. A área de epitélio foi calculada subtraindo a AT pela AL, enquanto a relação túbulo/epitélio (RT/E) foi obtida por AT/AE.

### 3.9 Análise histopatológica tubular

Para se estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos, foram contados 200 secções de túbulos em campos aleatórios nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram considerados túbulos com patologias aqueles que apresentavam alteração morfológica. Os túbulos seminíferos foram classificados conforme o score de Johnsen (1970), sujeitos as seguintes modificações: 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.

### 3.10 Análise morfométrica intertubular

#### 3.10.1 *Proporções volumétricas e volume dos componentes intertubulares*

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, realizando-se a contagem de campos aleatoriamente distribuídos, nas preparações histológicas do testículo de cada animal.

Na proporção volumétrica no testículo, entre os elementos que compõem o compartimento intertubular foram investigadas as células de Leydig, tanto núcleo como citoplasma, vasos sanguíneos, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos, obtendo-se as proporções volumétricas entre estes por meio da equação:  $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\%I \times \%PVI) / 100$ , onde  $\%IT =$  Proporção volumétrica de intertúbulo no testículo e  $\%PVI =$  Proporção volumétrica do componente no intertúbulo.

Para cálculo do volume do intertúbulo, bem como dos elementos que o compõe, utilizou-se a fórmula:  $\text{Volume} = \% \text{ de intertúbulo ou do elemento no testículo} \times \text{PPT} / 100$ , onde: PPT= peso do parênquima testicular.

#### 3.10.2 *Diâmetro nuclear, volumes nuclear, citoplasmático e da célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo*

Foi medido o diâmetro nuclear médio, em  $\mu\text{m}$ , das células de Leydig em aumento de 400X, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram mais esféricos e com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A partir das fórmulas abaixo, foram calculados então o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig (VL), em  $\mu\text{m}^3$ :  $\text{VNL} = 4/3 \pi R^3$ , onde R= Raio nuclear;  $\text{VCL} = \%CL \times \text{VNL} / \%NL$ , onde  $\%CL =$  Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig e  $\%NL =$  Proporção volumétrica de núcleo de Leydig;  $\text{VL} = \text{VNL} + \text{VCL}$ .

O volume que a célula de Leydig ocupa por testículo (VLT), em  $\mu\text{L}$ , foi calculado a partir da fórmula:  $\text{VLT} = (\%Ley \times \text{PPT}) / 100$ , onde  $\%Ley =$  Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e PPT= Peso do parênquima testicular. O volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (VL/gT), em  $\mu\text{L}$ , foi calculado a partir da

fórmula:  $VL/gT = VLT / PT$ , onde VLT= Volume que a célula de Leydig ocupa por testículo, e PT= dos testículos.

De posse do volume individual da célula de Leydig e do volume total ocupado por estas células no testículo, foram calculados o número de células de Leydig por testículo (NL) e por grama de testículo (NLg/T), por meio da seguinte equação:  $NL = VLT / VL$ , onde: VLT= Volume de Leydig por testículo e VL= Volume de uma célula de Leydig.  $NLg/T = NL / PT$ , onde PT= Peso testicular.

### 3.10.3 Índice Leydigossomático

Este índice determina o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, e foi obtido a partir da fórmula:  $ILS = (VCL / PC) \times 100$ , onde VCL= Volume de células de Leydig nos dois testículos e PC= Peso corporal.

## 3.11 Estresse oxidativo

### 3.11.1 Análises das enzimas antioxidantes

Cem miligramas do tecido testicular de camundongos Balb/c tratados com extrato aquoso da flor de *Dianthus caryophyllus* foram homogeneizados em 1000 $\mu$ L de tampão fosfato (pH 7.4). A suspensão foi centrifugada (12000 rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante utilizado nas análises.

A atividade enzimática da CAT foi mensurada segundo Aebi et al., (1984) pela taxa de queda da absorvância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 7.0) e homogenato de tecido em espectrofotômetro ( $\lambda = 240$  nm). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio  $\epsilon_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  e os resultados expressos em U CAT/mg proteína.

A atividade enzimática da SOD foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm baseado na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (DIETERICH et al., 2000). Os resultados foram expressos em U SOD/ mg tecido.

A atividade enzimática da GST foi mensurada de acordo com Habig et al. (1974), através da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada em uma mistura contendo CNDNB 1 mM em etanol, Glutathione Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e homogenato de tecido pelo aumento da absorvância ( $\lambda = 340$  nm) por 90 segundos. O coeficiente de extinção molar do CNDNB  $\epsilon_{340} =$

9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em μmole/min/g tecido.

### 3.11.2 Óxido nítrico (ON)

O homogenato dos tecidos para os testes de ON foi preparado como descrito acima para as enzimas. O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Desta forma, 50μL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida foi determinada em leitor de microplacas (λ= 540 nm). A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em mmol/L (RICART-JANÉ et al., 2002; DROGE, 2002).

### 3.11.3 Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA)

O homogenato dos tecidos para os testes de MDA foi preparado como descrito para as enzimas. Foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e ácido clorídrico 0,25 M), pois as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica. Assim, o MDA é um importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. Posteriormente o homogenato foi aquecido em água fervente por 40 minutos a temperatura de 90°C, resfriado, adicionado álcool butílico (600mL), agitado em vórtex e centrifugado a 6000 rpm. A fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas (λ = 532 nm). A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em nmole/g tecido (BUEGE e AUST, 1978).

#### 4. Resultados

Os dados biométricos corporais e testiculares, os índices gonadossomático e parenquimossomático encontram-se na tabela 2. Não houve alteração em qualquer um dos parâmetros analisados.

Tabela 2. Parâmetros biométricos corporais e testiculares (g) e índices gonadossomático e parenquimossomático (%) de camundongos tratados com EADC (Extrato aquoso de *Dianthus caryophyllus*) de forma contínua e descontínua.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
<b>PC</b>	33,49±1,78 <sup>a</sup>	36,50±3,29 <sup>a</sup>	35,66±4,20 <sup>a</sup>	37,73±4,18 <sup>a</sup>	35,67±3,02 <sup>a</sup>	36,97±2,35 <sup>a</sup>
<b>PT</b>	0,26±0,04 <sup>a</sup>	0,23±0,05 <sup>a</sup>	0,29±0,04 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>	0,24±0,06 <sup>a</sup>	0,23±0,03 <sup>a</sup>
<b>PA</b>	0,013±0,003 <sup>a</sup>	0,033±0,048 <sup>a</sup>	0,018±0,006 <sup>a</sup>	0,013±0,003 <sup>a</sup>	0,016±0,006 <sup>a</sup>	0,016±0,005 <sup>a</sup>
<b>PP</b>	0,24±0,03 <sup>a</sup>	0,20±0,08 <sup>a</sup>	0,27±0,04 <sup>a</sup>	0,24±0,02 <sup>a</sup>	0,22±0,06 <sup>a</sup>	0,22±0,03 <sup>a</sup>
<b>IGS</b>	0,77±0,11 <sup>a</sup>	0,63±0,15 <sup>a</sup>	0,82±0,19 <sup>a</sup>	0,67±0,10 <sup>a</sup>	0,69±0,20 <sup>a</sup>	0,64±0,12 <sup>a</sup>
<b>IPS</b>	0,73±0,11 <sup>a</sup>	0,53±0,22 <sup>a</sup>	0,77±0,18 <sup>a</sup>	0,64±0,10 <sup>a</sup>	0,64±0,19 <sup>a</sup>	0,60±0,11 <sup>a</sup>

G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. PC – Peso corporal; PG – 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 ( $p \leq 0,05$ ).

A porcentagem dos componentes testiculares, altura de epitélio, diâmetro tubular, diâmetro do lume, índices tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IPS) estão dispostos na tabela 3. Não houve alteração no percentual de túbulos seminíferos, mas o percentual de epitélio aumentou nos grupos tratados enquanto o percentual de lume diminuiu nos mesmos grupos. Houve aumento de túnica própria apenas no grupo G2. A altura do epitélio foi menor em G2 e maior em G3. O diâmetro tubular diminuiu em G5, enquanto o diâmetro do lume reduziu nos grupos G3, G4, G5 e G6. Não houve alterações nos índices tubulossomático e epiteliossomático.

Tabela 3. Proporção dos componentes testiculares (%), medidas da altura de epitélio, diâmetro tubular e do lume ( $\mu\text{m}$ ), índices tubulossomático e epiteliossomático (%) de camundongos tratados com EADC (Extrato aquoso de *Dianthus caryophyllus*), de forma contínua e descontínua.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
<b>T</b>	86,27 $\pm$ 2,23 <sup>a</sup>	87,78 $\pm$ 3,84 <sup>a</sup>	88,83 $\pm$ 1,91 <sup>a</sup>	86,04 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>	85,32 $\pm$ 3,20 <sup>a</sup>	85,24 $\pm$ 4,06 <sup>a</sup>
<b>E</b>	62,05 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	66,19 $\pm$ 4,17 <sup>b</sup>	70,70 $\pm$ 1,31 <sup>b</sup>	69,87 $\pm$ 2,56 <sup>b</sup>	67,31 $\pm$ 3,75 <sup>b</sup>	67,56 $\pm$ 3,30 <sup>b</sup>
<b>TP</b>	10,37 $\pm$ 1,42 <sup>a</sup>	12,21 $\pm$ 1,47 <sup>b</sup>	9,09 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	9,02 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	10,27 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	9,16 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>
<b>L</b>	13,85 $\pm$ 1,47 <sup>a</sup>	9,39 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>	9,04 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>	7,15 $\pm$ 1,20 <sup>b</sup>	7,74 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>	8,52 $\pm$ 1,87 <sup>b</sup>
<b>AE</b>	75,37 $\pm$ 3,23 <sup>a</sup>	70,69 $\pm$ 6,79 <sup>ab</sup>	81,15 $\pm$ 3,97 <sup>ac</sup>	73,17 $\pm$ 7,38 <sup>a</sup>	77,09 $\pm$ 7,90 <sup>a</sup>	74,13 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>
<b>DT</b>	199,29 $\pm$ 8,81 <sup>a</sup>	189,84 $\pm$ 20,38 <sup>ab</sup>	197,83 $\pm$ 16,12 <sup>a</sup>	186,30 $\pm$ 13,44 <sup>ab</sup>	175,08 $\pm$ 8,23 <sup>b</sup>	186,56 $\pm$ 5,67 <sup>ab</sup>
<b>DL</b>	123,92 $\pm$ 8,00 <sup>a</sup>	115,15 $\pm$ 21,64 <sup>a</sup>	35,54 $\pm$ 9,20 <sup>b</sup>	39,96 $\pm$ 13,63 <sup>b</sup>	20,91 $\pm$ 11,01 <sup>b</sup>	38,30 $\pm$ 6,75 <sup>b</sup>
<b>ITS</b>	0,63 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,68 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,51 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<b>IES</b>	0,45 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,36 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,54 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>

G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. T – Porcentagem de túbulos seminíferos; E – Porcentagem de epitélio; TP – Porcentagem de túnica própria; L – Porcentagem de lume; AE – Altura do epitélio; DT- Diâmetro tubular; DL – Diâmetro do lume; ITS- Índice tubulossomático; IES – Índice epiteliossomático. Dados expressos como média $\pm$ DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p\leq 0,05$ ).

Os volumes dos componentes testiculares estão dispostos na tabela 4. Não houve alteração nos volumes de túbulos seminíferos, epitélio e túnica própria, porém o volume de lume diminuiu em todos os grupos tratados.

Tabela 4. Volumetria tubular (ml) de camundongos tratados com EADC (Extrato aquoso de *Dianthus caryophyllus*), de forma contínua e descontínua.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
<b>VT</b>	0,211±0,030 <sup>a</sup>	0,175±0,077 <sup>a</sup>	0,237±0,033 <sup>a</sup>	0,206±0,016 <sup>a</sup>	0,191±0,051 <sup>a</sup>	0,186±0,030 <sup>a</sup>
<b>VE</b>	0,152±0,021 <sup>a</sup>	0,133±0,061 <sup>a</sup>	0,189±0,026 <sup>a</sup>	0,167±0,02 <sup>a</sup>	0,151±0,040 <sup>a</sup>	0,147±0,020 <sup>a</sup>
<b>VTP</b>	0,025±0,004 <sup>a</sup>	0,024±0,010 <sup>a</sup>	0,024±0,004 <sup>a</sup>	0,022±0,003 <sup>a</sup>	0,023±0,006 <sup>a</sup>	0,020±0,004 <sup>a</sup>
<b>VL</b>	0,034±0,007 <sup>a</sup>	0,018±0,007 <sup>b</sup>	0,024±0,005 <sup>b</sup>	0,017±0,002 <sup>b</sup>	0,017±0,006 <sup>b</sup>	0,019±0,07 <sup>b</sup>

G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. VT – Volume de túbulos seminíferos; VE – Volume de epitélio; VTP – Volume de túnica própria; VL – Volume de lume. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05).

Na tabela 5 estão os dados de comprimento total túbulos seminíferos no testículo e por grama de testículo, áreas de túbulo, epitélio e lume e a relação túbulo/epitélio. Não houve alteração nas medidas do comprimento total de túbulo no testículo ou por grama de testículo. A área de túbulos seminíferos diminuiu em G5. Por outro lado, a área de epitélio aumentou em G3, G5, enquanto a área de lume e a relação túbulo/epitélio reduziu em todos os grupos tratados com a planta.

Tabela 4. Comprimento de túbulo (m) e área tubular ( $\mu\text{m}^2$ ) de camundongos tratados com EADC (Extrato aquoso de *Dianthus caryophyllus*) de forma contínua e descontínua.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
<b>CT/T</b>	6,83±1,26 <sup>a</sup>	6,12±2,53 <sup>a</sup>	7,96±2,01 <sup>a</sup>	7,63±1,31 <sup>a</sup>	7,96±1,95 <sup>a</sup>	6,83±1,07 <sup>a</sup>
<b>CT/gT</b>	26,44±2,61 <sup>a</sup>	26,07±8,70 <sup>a</sup>	27,54±4,29 <sup>a</sup>	30,31±4,48 <sup>a</sup>	33,20±2,73 <sup>a</sup>	29,10±2,22 <sup>a</sup>
<b>AT(10<sup>3</sup>)</b>	31,22±2,78 <sup>a</sup>	28,37±3,33 <sup>ab</sup>	30,89±5,17 <sup>a</sup>	27,36±3,83 <sup>ab</sup>	24,11±2,24 <sup>b</sup>	27,34±1,66 <sup>ab</sup>
<b>AE(10<sup>3</sup>)</b>	19,13±1,42 <sup>a</sup>	17,65±3,70 <sup>a</sup>	29,84±4,63 <sup>b</sup>	25,98±3,55 <sup>bc</sup>	23,67±2,29 <sup>c</sup>	26,15±1,40 <sup>bc</sup>
<b>AL(10<sup>2</sup>)</b>	120,97±15,7 <sup>a</sup>	107,14±42,13 <sup>a</sup>	10,46±5,66 <sup>b</sup>	13,75±9,21 <sup>b</sup>	4,38±2,71 <sup>b</sup>	11,81±3,83 <sup>b</sup>
<b>RT/E</b>	1,63±0,06 <sup>a</sup>	1,65±0,34 <sup>a</sup>	1,03±0,01 <sup>b</sup>	1,05±0,04 <sup>b</sup>	1,02±0,01 <sup>b</sup>	1,04±0,01 <sup>b</sup>

G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. CT/T – Comprimento tubular no testículo; CT/gT- Comprimento tubular por grama de testículo; AT – Área de túbulo seminífero; AE – Área de epitélio; AL – Área de lume; R T/E – Relação túbulo/epitélio. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05).

A figura 1 mostra a proporção das alterações tubulares. Observou-se redução da proporção de túbulos seminíferos íntegros em todos os grupos tratados. A porcentagem de túbulos com vacúolos na base do epitélio seminífero diminuiu em G2, G4, G5 e G6. Vacúolos em todo o epitélio aumentaram em todos os grupos. Não houve alteração na quantidade de túbulos em degeneração entre os grupos tratados. As imagens das alterações estruturais estão ilustradas na figura 2.

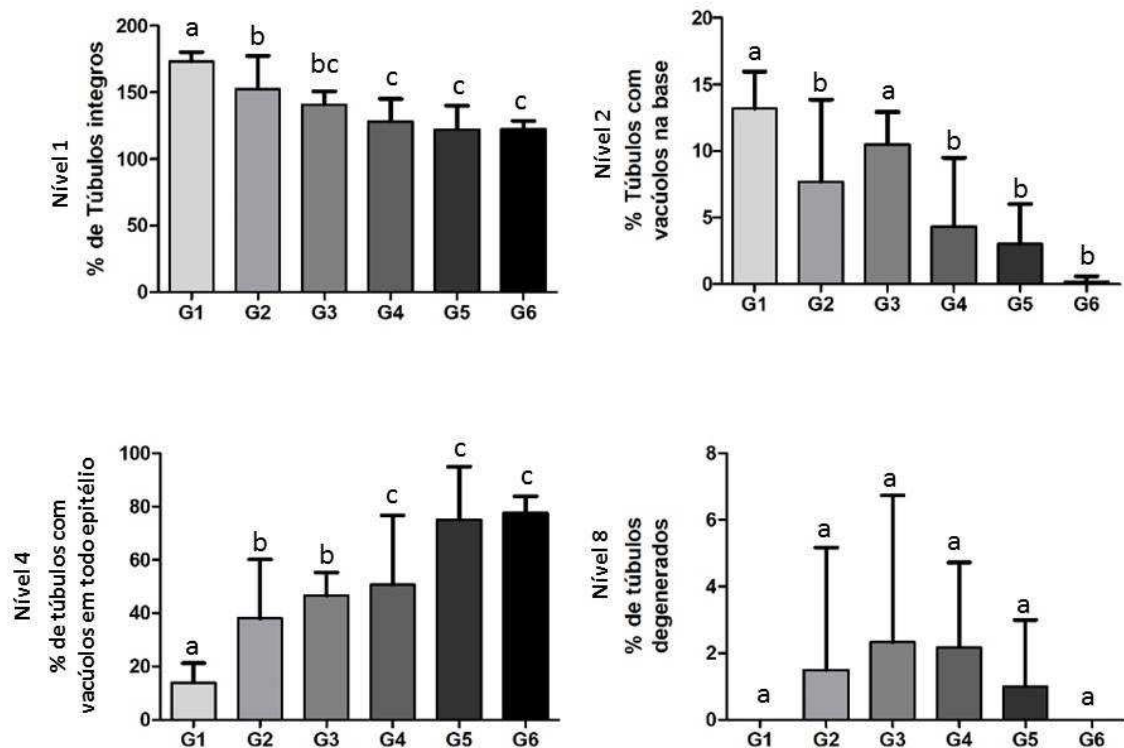


Figura 1. Percentual de túbulos seminíferos íntegros, vacuolizados e degenerados, de camundongos tratados com EADC, de forma contínua e descontínua. G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

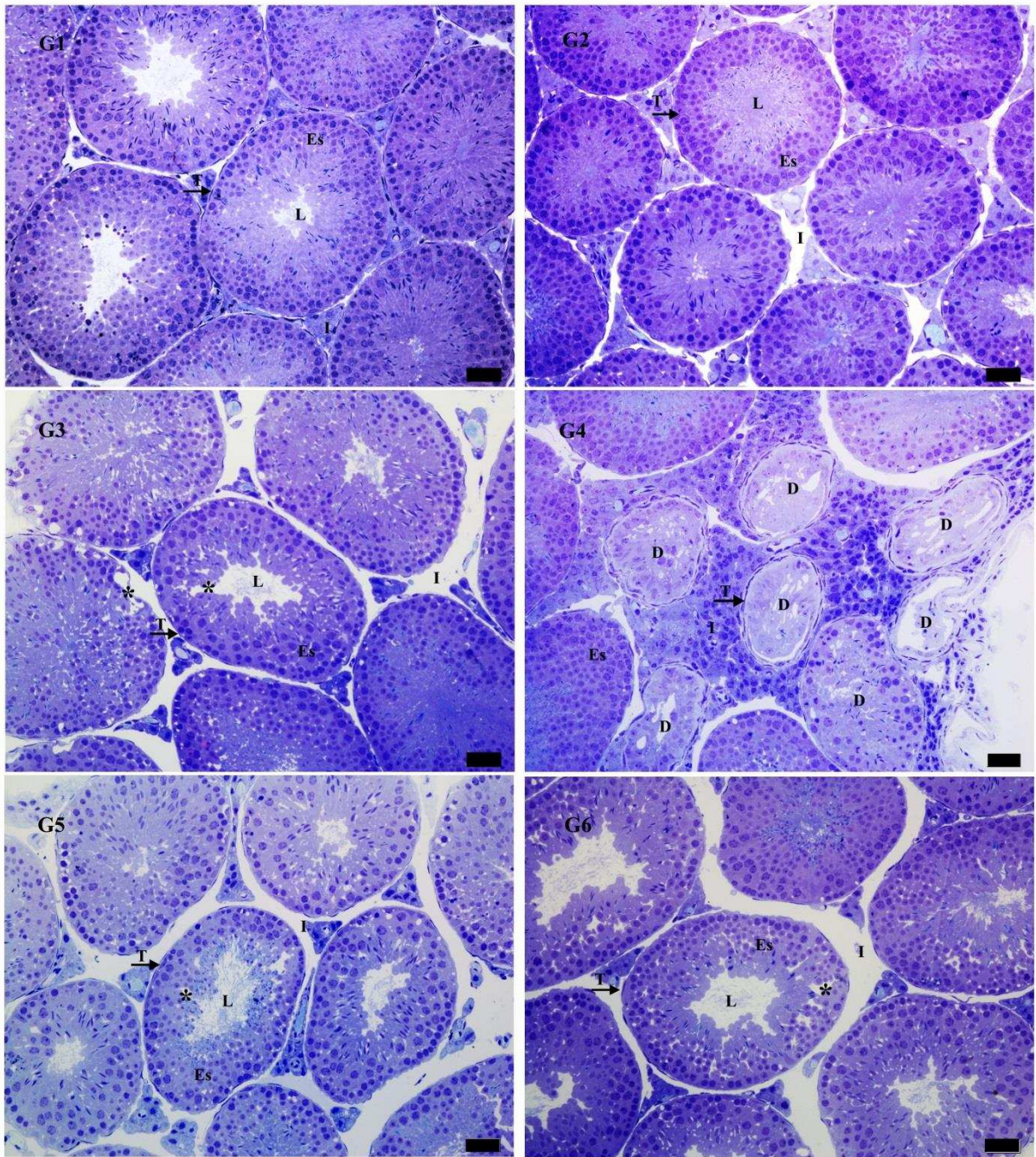


Figura 2. Alterações estruturais tubulares de camundongos tratados com EADC, de forma contínua e descontínua. G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. T- Túnica própria; Es – Epitélio seminífero; L – Lume; I – Intertúbulo; D – Degeneração; \* - Vacúolo. Barras 20µm.

Na tabela 6 estão apresentados os valores das proporções e volumetria dos componentes intertubulares. Dos componentes intertubulares houve aumento da proporção de células de Leydig em G6 e de tecido conjuntivo em G5. Não houve alteração nos volumes de intertúbulo, vasos sanguíneos e espaço linfático. O volume da célula de Leydig e do seu núcleo assim como o volume de tecido conjuntivo e macrófagos reduziram em G2. O volume de tecido conjuntivo aumentou em G4, G5 e G6.

Os valores do diâmetro do núcleo, os volumes do núcleo, citoplasma e da célula, o volume da célula por testículo e por grama de testículo, bem o número de célula de Leydig por testículo e por grama de testículo e o ILS estão na tabela 7. Não houve alterações no diâmetro, no volume nuclear e da célula de Leydig entre os grupos. O volume das células de Leydig no testículo diminuiu em G2, enquanto por grama de testículo aumentou em G6. O número de células de Leydig no testículo diminuiu em G2 e aumentou em G6, quando avaliado por grama de testículo houve aumento em G5 e G6. O ILS reduziu apenas em G2.

Imagens do intertúbulo dos grupos estão na figura 3.

Tabela 6. Percentual e volume testicular de elementos intertubulares, de camundongos tratados com EADC (Extrato aquoso de *Dianthus caryophyllus*) de forma contínua e descontínua.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
<b>I (%)</b>	13,89±2,23 <sup>a</sup>	12,08±3,84 <sup>a</sup>	11,21±1,91 <sup>a</sup>	13,96±1,92 <sup>a</sup>	14,68±3,20 <sup>a</sup>	14,75±4,06 <sup>a</sup>
<b>VS(%)</b>	0,81±0,28 <sup>a</sup>	0,77±0,27 <sup>a</sup>	0,62±0,18 <sup>a</sup>	0,79±0,28 <sup>a</sup>	0,74±0,13 <sup>a</sup>	0,66±0,33 <sup>a</sup>
<b>EL(%)</b>	5,54±1,66 <sup>a</sup>	4,42±1,38 <sup>a</sup>	3,15±1,32 <sup>a</sup>	4,41±1,13 <sup>a</sup>	4,62±1,78 <sup>a</sup>	3,77±1,66 <sup>a</sup>
<b>CL(%)</b>	6,54±0,68 <sup>a</sup>	6,00±2,14 <sup>a</sup>	6,24±1,08 <sup>a</sup>	7,40±1,13 <sup>ab</sup>	7,75±1,31 <sup>ab</sup>	9,00±2,06 <sup>b</sup>
<b>TC(%)</b>	0,45±0,13 <sup>a</sup>	0,54±0,22 <sup>a</sup>	0,67±0,21 <sup>a</sup>	0,78±0,21 <sup>a</sup>	0,89±0,17 <sup>b</sup>	0,77±0,30 <sup>a</sup>
<b>M(%)</b>	0,55±0,38 <sup>a</sup>	0,35±0,33 <sup>a</sup>	0,53±0,15 <sup>a</sup>	0,58±0,12 <sup>a</sup>	0,69±0,13 <sup>a</sup>	0,55±0,19 <sup>a</sup>
<b>I (mL)</b>	0,034±0,008 <sup>a</sup>	0,022±0,008 <sup>a</sup>	0,030±0,005 <sup>a</sup>	0,033±0,007 <sup>a</sup>	0,032±0,070 <sup>a</sup>	0,032±0,009 <sup>a</sup>
<b>VS (mL)</b>	20±8,15 <sup>a</sup>	14,67±7,79 <sup>a</sup>	16,74±5,95 <sup>a</sup>	18,73±6,00 <sup>a</sup>	16,58±5,52 <sup>a</sup>	14,52±7,29 <sup>a</sup>
<b>EL (mL)</b>	136, 17±49,83 <sup>a</sup>	79,14±27,02 <sup>a</sup>	81,73±25,85 <sup>a</sup>	106,41±35,59 <sup>a</sup>	98,79±32,9 <sup>a</sup>	83,63±37,59 <sup>a</sup>
<b>NCL(mL)</b>	49,01±10,55 <sup>a</sup>	31,33±14,80 <sup>b</sup>	56,10±12,44 <sup>a</sup>	61,22±13,90 <sup>a</sup>	62,97±11,84 <sup>a</sup>	66,90±8,51 <sup>a</sup>
<b>CCL(mL)</b>	110,84±21,95 <sup>a</sup>	78,26±33,72 <sup>ab</sup>	112,36±32,01 <sup>a</sup>	115,18±20,68 <sup>a</sup>	105,36±19,38 <sup>a</sup>	128,54±36,91 <sup>ac</sup>
<b>CL(mL)</b>	159,85±27,35 <sup>a</sup>	109,59±48,25 <sup>b</sup>	168,46±43,32 <sup>ab</sup>	176,80±33,62 <sup>a</sup>	168,33±30,00 <sup>a</sup>	195,44±43,70 <sup>a</sup>
<b>TC(mL)</b>	11,03±3,31 <sup>a</sup>	9,6±4,07 <sup>ac</sup>	17,65±3,6 <sup>ab</sup>	18,64±5,68 <sup>b</sup>	19,00±2,29 <sup>b</sup>	17,12±7,71 <sup>b</sup>
<b>M(mL)</b>	13,55±10,16 <sup>a</sup>	4,87±1,03 <sup>b</sup>	14,27±4,69 <sup>a</sup>	13,7±2,52 <sup>a</sup>	14,71±2,49 <sup>a</sup>	11,99±4,41 <sup>a</sup>

G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. I- Intertúbulo; VS – Vaso sanguíneo; EL – Espaço linfático; CL – Célula de Leydig; TC – Tecido conjuntivo; M – Macrófago; NCL – núcleo da célula de Leydig; CCT – citoplasma da célula de Leydig. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05).

Tabela 7. Volumetria das células de Leydig, volume e número no testículo e por grama de testículo e ILS de camundongos tratados com EADC (Extrato aquoso de *Dianthus caryophyllus*) de forma contínua e descontínua.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>	<b>G6</b>
<b>DNL (µm)</b>	6,65±0,23 <sup>a</sup>	6,99±0,57 <sup>a</sup>	6,88±1,12 <sup>a</sup>	7,11±0,84 <sup>a</sup>	6,32±0,21 <sup>a</sup>	6,01±0,26 <sup>a</sup>
<b>VNL(µm<sup>3</sup>)</b>	154,02±15,58 <sup>a</sup>	181,84±44,01 <sup>a</sup>	182,36±98,88 <sup>a</sup>	194,58±77,46 <sup>a</sup>	132,75±13,04 <sup>a</sup>	114,17±14,08 <sup>a</sup>
<b>VCL(µm<sup>3</sup>)</b>	356,30±79,94 <sup>a</sup>	457,50±82,00 <sup>ab</sup>	370,11±216,94 <sup>a</sup>	381,64±214,03 <sup>a</sup>	223.14±28,10 <sup>ac</sup>	217,78±56,41 <sup>ac</sup>
<b>VL(µm<sup>3</sup>)</b>	510,33±90,52 <sup>a</sup>	639,34±123,22 <sup>a</sup>	552,47±314,46 <sup>a</sup>	576,22±291,22 <sup>a</sup>	355,89±37,55 <sup>a</sup>	331,95±66,03 <sup>a</sup>
<b>VCL/T(10<sup>9</sup>)</b>	15,98±2,73 <sup>a</sup>	10,96±4,82 <sup>b</sup>	16,84±4,33 <sup>a</sup>	17,68±3,36 <sup>a</sup>	16,83±3,00 <sup>a</sup>	19,51±4,37 <sup>a</sup>
<b>VCL/gT (10<sup>4</sup>)</b>	0,062±0,006 <sup>a</sup>	0,046±0,015 <sup>ab</sup>	0,059±0,11 <sup>a</sup>	0,07±0,01 <sup>ac</sup>	0,072±0,013 <sup>ac</sup>	0,084±0,02 <sup>c</sup>
<b>Nº CL/T (10<sup>6</sup>)</b>	32,57±9,89 <sup>a</sup>	16,84±5,7 <sup>b</sup>	32,25±13,72 <sup>a</sup>	34,74±11,42 <sup>a</sup>	47,39±8,10 <sup>ac</sup>	59,83±13,5 <sup>c</sup>
<b>Nº CL/gT (10<sup>7</sup>)</b>	12,66±3,55 <sup>a</sup>	7,24±18,86 <sup>a</sup>	12,72±5,61 <sup>a</sup>	13,68±3,97 <sup>a</sup>	20,67±4,81 <sup>b</sup>	25,85±6,35 <sup>b</sup>
<b>ILS (%)</b>	0,048±0,008 <sup>a</sup>	0,030±0,013 <sup>b</sup>	0,049±0,017 <sup>a</sup>	0,047±0,009 <sup>a</sup>	0,048±0,010 <sup>a</sup>	0,053±0,012 <sup>a</sup>

G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. DNL – Diâmetro nuclear de Leydig; VNL – Volume nuclear de Leydig; VCL – Volume citoplasmático de Leydig; VL – Volume de Leydig; VCL/T – Volume de Leydig por testículo; VCL/gT – Volume de célula de Leydig por grama de testículo; Nº CL/T – Número de Células de Leydig por testículo; Nº CL/gT – Número de células de Leydig por grama de testículo. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05).

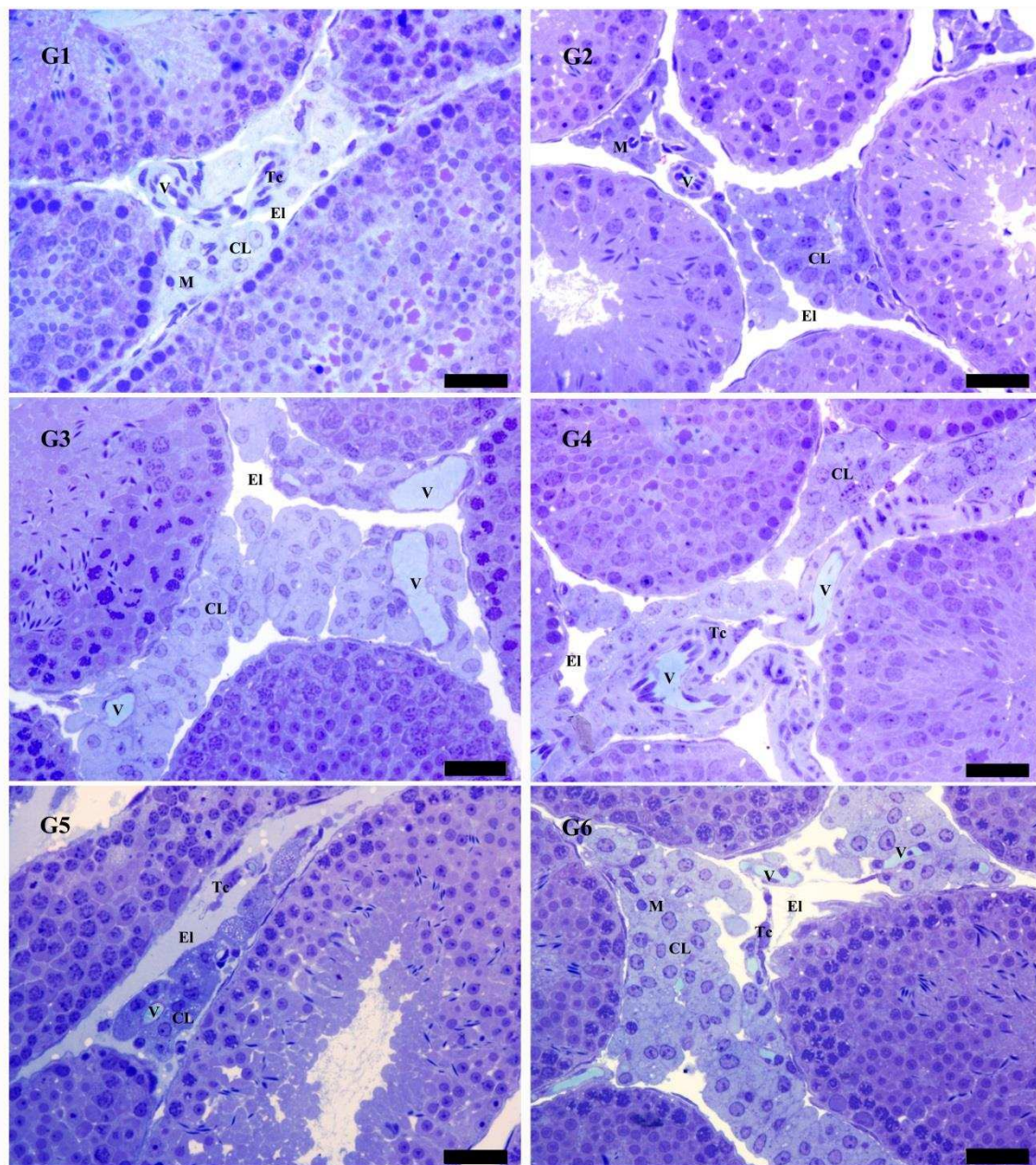


Figura 3. Intertúbulo de camundongos tratados com EADC, de forma contínua e descontínua. G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. El – Espaço linfático; V- Vaso sanguíneo; CL – Célula de Leydig; Tc – Tecido conjuntivo; M - Macrófago. Barras 20µm.

Na figura 4 observam-se os gráficos das dosagens das enzimas antioxidantes e as dosagens de MDA e ON. Não houve alterações nas dosagens de ON, GST e SOD, mas CAT aumentou apenas em G6, assim como o MDA em todos os grupos tratados.

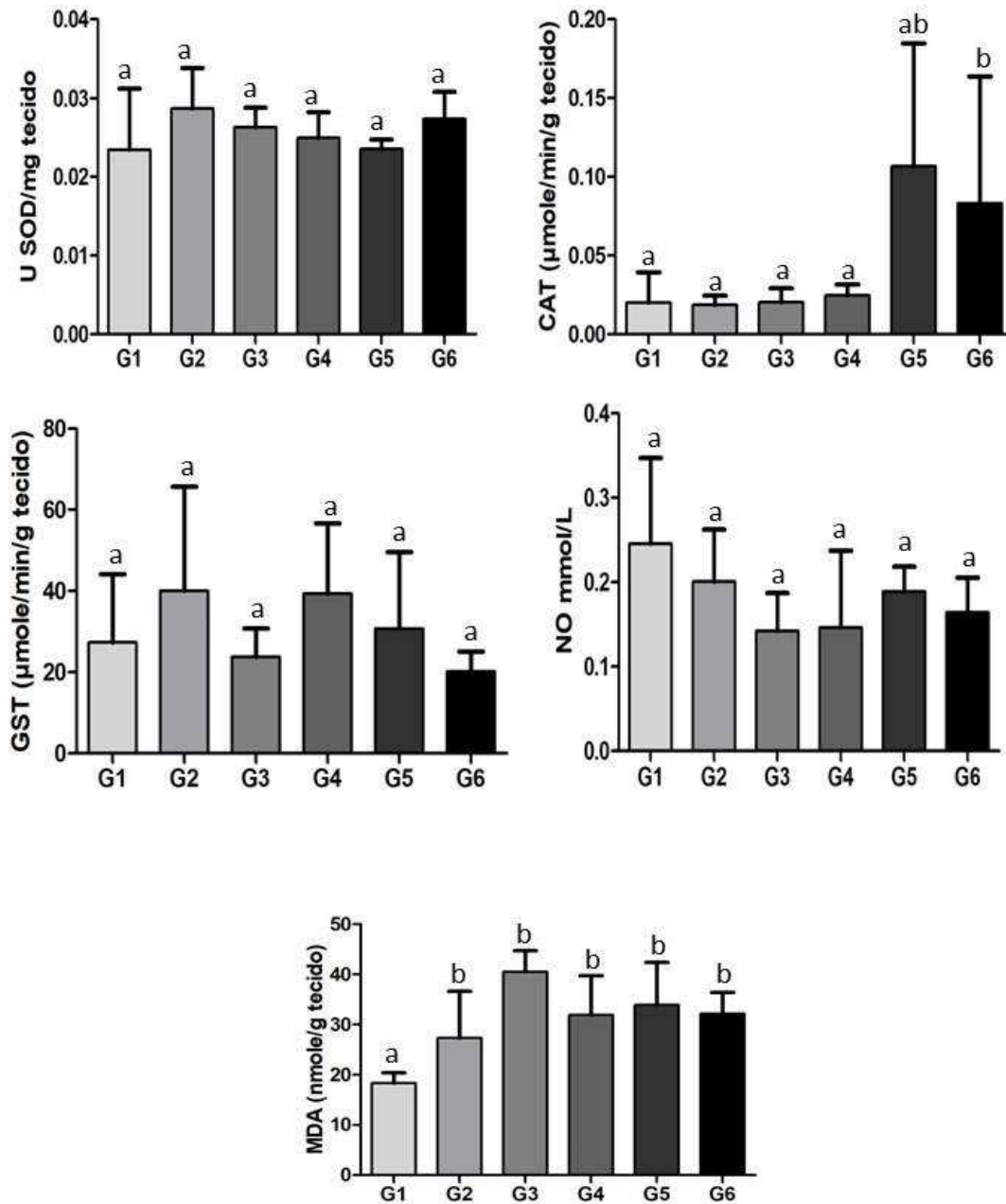


Figura 4. Variação da concentração de enzimas antioxidantes e de MDA e ON em camundongos tratados com EADC, de forma contínua e descontínua. G1 – Controle; G2 – Citrato de Sildenafil; G3 – EADC 10mg/Kg, G4 – EADC 20mg/kg, G5 – EADC 40mg/Kg; G6 – EADC 40 mg/Kg descontínuo. Dados expressos como média $\pm$ DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. Discussão

Os dados biométricos corporais e testiculares não sofreram mudanças pelo tratamento com *D. caryophyllus*, mantendo assim os índices testiculares. Estes resultados são semelhantes aos observados em camundongos tratados com extrato aquoso de *Ouratea semiserrata*, o qual também não alterou o ITS e IGS dos animais (MATTA, 2008). Por outro lado, animais tratados com fração enriquecida em flavonoide da *Davilla elliptica* apresentaram redução do IPS e IES no grupo tratado com maior dose do extrato (SILVA, 2017).

Os túbulos seminíferos são os principais componentes testiculares analisados para avaliar os parâmetros reprodutivos, assim como a medida do diâmetro tubular, altura e volume do epitélio seminífero são usados para avaliar a atividade espermatogênica (FRANÇA e RUSSELL, 1998; PAULA et al., 2002). Apesar da altura do epitélio seminífero não ter sido alterada em relação ao controle, a proporção desse componente aumentou em todos os grupos tratados com a planta o que sugere que o número de células no epitélio tenha aumentado. Porém, camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* mostraram redução neste parâmetro, indicando interferência negativa da planta no epitélio seminífero (MATTA, 2012).

Neste estudo houve também aumento da área de epitélio seminífero em todos os grupos tratados com *D. caryophyllus*. Este dado, junto com o aumento da proporção de epitélio é indicativo de aumento da produção espermática. Contudo, não houve alteração no volume de epitélio o que justifica a manutenção do índice epiteliossomático semelhante ao controle. Li et al. (2010) descreveram as propriedades do polifenol kaempferol presente em *D. caryophyllus* e verificaram a sua ação no testículo de camundongos relatando que esse flavonoide pôde se ligar ao receptor de estrogênio, exerceu ação negativa sobre espermatozoides e estimulou a mitose das espermatogônias, o que pode justificar o aumento da área de epitélio seminífero nos animais deste trabalho.

Todos os grupos tratados com *D. caryophyllus* mostraram redução no diâmetro de lúmen, o que certamente refletiu na redução da proporção, área e volume desse componente, em resposta ao aumento do epitélio seminífero. Contudo, animais tratados com extrato alcoólico de *Tynanthus fasciculatus*, conhecido por apresentar efeitos antioxidantes e afrodisíacos, não gerou alterações morfométricas no lúmen tubular (DAMASCENO, 2017).

O diâmetro tubular reduziu apenas em G5 (EADC40), embora nos demais grupos os valores tenham sido menores em relação ao controle. Essa redução também foi observada nos tratamentos com as plantas *Aspalathus linearis* que mostrou melhorar os parâmetros reprodutivos e *Carthamus tinctorius* as quais não tiveram efeitos benéficos na espermatogênese como observado por Opuwari et al.(2014) e Mirhoseini et al.(2012), respectivamente. Houve redução da área tubular apenas em G5 enquanto nos outros grupos tratados a área se manteve, apesar da proporção e volume não terem alterado, assim como em animais tratados com *Anemopaegma arvense* também conhecida por sua ação afrodisíaca e usada como tônico (CHIEREGATTO, 2005). Desse modo, nota-se uma relação positiva entre a área de túbulo e epitélio, o que permite supor que o tratamento possa ter favorecido a gametogênese.

Apesar da redução do diâmetro tubular no grupo G5, o comprimento de túbulo por testículo e por grama de testículo não foi alterado pelo tratamento mantendo o volume tubular, sendo que esse padrão também foi observado em ratos tratados com extrato aquoso de catuaba (GOMES, 2007).

Houve aumento da proporção de células de Leydig apenas em G6, semelhante ao observado em ratos tratados com extrato de *Ginko biloba* (OSHIO, 2012). Por outro lado, na volumetria das células de Leydig não houve alterações em relação ao controle, semelhante ao observado em animais tratados com *Heteropterys aphrodisiaca* (MONTEIRO et al., 2008). Esse aumento na proporção de células de Leydig é reflexo do aumento do seu número e não do volume dessas células.

O número de células de Leydig por grama de testículo aumentou nos grupos de maiores dosagens, G5 (EADC40) e G6 (EADC40D), enquanto por testículo esse aumento foi significativo apenas em G6, o que sugere que os níveis de testosterona possam ter aumentado nesses grupos. A estimativa da população das células de Leydig pode ser usada como parâmetro para monitorar os níveis de testosterona como constatado por Castro et al. (2002) em coelhos, havendo uma relação direta entre a quantidade destas células e a dosagem do hormônio. Relação direta também foi verificada por Tahtamouni et al. (2016) que tratou ratos com o extrato aquoso de *Taraxacum officinale* e verificou que o número de células de Leydig diminuiu com a redução de testosterona nos animais.

Houve aumento na volumetria de tecido conjuntivo em G4 (EADC20), G5 (EADC40) e G6 (EADC40D), mas a proporção desse componente aumentou apenas em G5 (EADC40). Aumento semelhante foi observado em ratos expostos ao chumbo

(NEVES, 2016) e cádmio (NASCIMENTO, 2017). Estes autores sugerem que o aumento no tecido conjuntivo dificulte a movimentação de fluidos e hormônios entre os dois compartimentos testiculares e que esse fato possa interferir na espermatogênese. O aumento do volume de tecido conjuntivo foi acompanhando o aumento da proporção desse componente, que nesse estudo aconteceu apenas em G5.

Embora o volume de células de Leydig tenha sido apenas numericamente maior na análise por testículo, esse aumento foi mais notável quando avaliado por grama de testículo no grupo G6 (EADC40D), indicando que houve aumento do volume ocupado pelas células no testículo, refletindo o aumento da quantidade de células. Contudo o ILS não sofreu diferença porque o volume da célula por testículo e o peso corporal dos animais não alteraram.

Neste estudo a atividade da CAT aumentou em G6 (EADC40D), apesar de se notar que em todos os grupos esta atividade estivesse maior. Este fato sugere aumento na síntese de  $H_2O_2$  causada pelo extrato. Embora CAT tenha aumentado não houve mudanças na atividade de SOD. A CAT é uma enzima que catalisa a redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (DROGE, 2002).

Assim, entende-se que o extrato aquoso da flor de *Dyanthus caryophyllus* pode causar estresse oxidativo testicular comprovado pelo aumento na atividade da catalase e pelo aumento na produção de MDA em todos os grupos tratados. O aumento de EROs pode iniciar a peroxidação lipídica das membranas expostas a ele, formando peroxidorradicais de ácidos graxos (VANNUCHI et al., 1998). Como resultado da peroxidação lipídica há aumento na produção de MDA que, neste estudo teve sua concentração aumentada em todos os grupos tratados. Como efeito da peroxidação lipídica há perda da seletividade da membrana da célula e das organelas o que pode levar a célula à morte. A perda da seletividade pode ter contribuído para a formação de vacúolos entre as células do epitélio seminífero como visto nos animais tratados, mas análises mais específicas devem ser feitas para comprovar a viabilidade ou não dessas células. Esses resultados permitem concluir que o extrato aquoso da planta *Dyanthus caryophyllus*, nas concentrações de 10, 20 40 mg/Kg e 40 mg/Kg de modo descontínuo, podem causar estresse oxidativo testicular, apesar de atividade antioxidante já descrita para os principais flavonoides da planta.

## 6. Conclusões

A avaliação dos efeitos do extrato aquoso de *Dianthus caryophyllus* nas dosagens analisadas foi capaz de promover alterações no compartimento tubular e intertubular. Nos túbulos seminíferos o tratamento pode ter favorecido a produção espermática nos grupos tratados com EADC. No compartimento intertubular, observou-se aumento na proporção e no número de células de Leydig o que sugere que o tratamento possa ter aumentado a síntese de testosterona nos grupos da maior dose, mas principalmente no grupo que recebeu o extrato em dias alternados. Contudo, a análise do estresse oxidativo indicou que houve peroxidação lipídica o que pode ter sido responsável pelo desenvolvimento de alterações estruturais nos túbulos seminíferos.

## 7. Referências bibliográficas

AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALBUQUERQUE U. P. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 20 (2), p. 139-44, 2001.

ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Revista Brasileira Ciência Movimento*, vol. 13(2), p. 7-15, 2005.

ARNOLD H. J.; GULUMIAN, M. Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda. *Journal Ethnopharmacology*, v. 12, p. 35-74, 1984.

BARREIROS A. L. B. S.; DAVID J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASCOM K. F.; OSTERUD H. L. Quantitative studies of the testicle. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anatomical Record*, v. 31 p. 159-169, 1925.

BONJAR S.; AGHIGHI S.; KARIMI A. N. Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions in Iran. *Journal Biological Sciences*, v. 4, p. 405-412, 2004.

BONJAR S.; KARIMI A. N. Antibacterial activity some medicinal plants Iran against *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Asian Journal Plant Sciences*, v. 3 (1), p. 61-64, 2004.

BRYANT A. T. *Zulu Medicine and Medicine-Men*. Centaur Struik Cape Town, p. 245-259, 1966.

BUEGE J. A.; AUST S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUTTAR H. S.; JONES K. L. What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? *Birth Defects Research (Part B)*, v. 68, p. 492-493, 2003.

CARMONA F.; PEREIRA A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Revista Brasileira Farmacologia*, v. 23, p. 379-385, 2013.

CASTRO A. C. S.; BERNDTSON W. E.; CARDOSO F. M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 493-498, 2002.

CHANDRA S.; RAWAT D. S. Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological properties. *Integrative Medicine Research*, v. 4, p. 123-131, 2015.

CHIEREGATTO L. C. Efeito do tratamento crônico de *Heteropterys aphrodisiaca* O. March e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. Viçosa – UFV, 2005. (Tese de doutorado)

CORRIGAN B. M.; VAN W. Y. K.; GELDENHUYS C. J.; JARDINE J. M. Ethnobotanical plant uses in the KwaNobela Peninsula, St. Lucia, South Africa. *South Africa Journal Botany*, v. 77, p. 346-359, 2011.

COSTA K. L. C.; MATTA S. L. P.; GOMES M. L. M.; PAULA T. A. R.; FREITAS K. M.; CARVALHO F. A. R.; SILVEIRA J. A.; DOLDER H.; MENDIS-HANDAGAMA S. M. L. C. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science*, v. 127, p. 202-212, 2011.

CUPP A. S; SKINNER M. K. Chapter 4:Embryonic Sertoli celldifferentiation. *Sertoli Cell Biology*, p.43-70, 2005.

D'CRUZ S. C.; VAITHINATHAN S.; JUBENDRADASS R.; MATHUR P. P. Effects of plants and plant products on the testis. *Asian Journal Andrology*, v. 12, p. 468-479, 2010.

DAMASCENO E. M. Efeitos do extrato alcoólico de cipó-cravo *Thynanthus fasciculatus* Miers (Bignoliaceae) sobre testículos de camundongos Swiss adultos. Viçosa – UFV, 2017. (Tese de doutorado)

DARIAS V.; BRAVO L.; RABANAL R.; MATEO C. S.; GONZALEZ R. M. G.; PÉREZ A. M. H. New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal Ethnopharmacology*, v. 25, p. 77-92, 1989.

DIETERICH S.; BIELIGK U.; BEULICH K.; HASENFUSS G.; PRESTLE J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Journal American Heart Association*, v. 101, p. 33-39, 2000.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.

FABRICANT D. S.; FARNSWORTH N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 69-75, 2001.

FERNANDEZ E .C.; SANDI Y. E.; KOKOSK L. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Bustillo Province of the Potosi Department, Bolivia. *Fitoterapia*, v. 74, p. 407-416, 2003.

FERREIRA A.L.A.; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Associação Médica Brasileira*, vol.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, p 132, 1998.

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*, p. 2486-2496, 2016.

FRANÇA L. R.; RUSSELL L. D. The testis of domestic animals. In: Martinez-Garcia F. & Regadera J. (Eds), *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219, 1998.

GALEOTTI F.; BARILE E.; CURIR P.; DOLCI M.; LANZOTTI V. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters*, v. 1, p. 44-48, 2008a.

GALEOTTI F.; BARILE E.; LANZOTTI V.; DOLCI M.; CURIR P. Quantification of Major Flavonoids in Carnation Tissues (*Dianthus caryophyllus*) as a Tool for Cultivar Discrimination. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, v. 63, p. 161-168, 2008b.

GE R.; CHEN G.; HARDY M. P. The role of the Leydig cell in spermatogenic function. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Landes Bioscience and Springer, p. 255-269, 2008.

GELFAND M. S.; MAVI R. B.; DRUMMOND N.; NDEMERA B. B. The Traditional Medicinal practitioner in Zimbabwe. Mambo Press, Gweru, p.543-563, 1985.

GODINHO C. L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Belo Horizonte – UFMG 1999. (Dissertação, mestrado)

GOMES M. L. M. Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. MELIACEAE) Viçosa - UFV 2007. (Dissertação, mestrado)

GONZALES G. F.; VASQUEZ V. B.; GASCO M. The transillumination technique as a method for the assessment of spermatogenesis using medicinal plants: The effect of extracts of black maca (*Lepidium meyenii*) and camucamu (*Myrciaria dubia*) on stages of the spermatogenic cycle in male rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 23 p. 1-29, 2013.

GOYAL H O.; WILLIAMS C. S.; KHALIL M. K.; VIG M. M.; MALONEY M. A. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail os the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. *Anatomical Record*, v. 254, p. 508-520, 1999.

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*, v. 249(22), p.7130-7139, 1974.

HEDRICH H. J.; BULLOCK G. *The Laboratory Mouse*, p. 133-166, 2004.

HERMO L.; PELLETIER M.; DANIEL G.; CHARLES E.; SMITH C. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells.

Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. Microscopy Research Technique, v.73, p. 243-278, 2010.

HESS R. A., DE FRANCA L. R. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Cheng C.Y. (eds) Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Advances in Experimental Medicine Biology, vol 636, p. 1-15, 2009.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Sertoli cell biology. Chapter 3: Structure of the Sertoli cell, p. 19-40, 2005.

HUCKINS C. The Spermatogonial Stem Cell Population in Adult Rats I. Their morphology, proliferation and maturation. Anatomical Record, v. 169, p. 533-558, 1971.

HULME M. M. Wild Flowers of Natal. Schuter and Shooter, Pietermaritzburg, p. 167-186, 1954.

HUTCHINGS A.; SCOTT A. H.; LEWIS G.; CUNNINGHAM A. Zulu Medicinal Plants: An Inventory. University of Natal Press, Pietermaritzburg, p. 569-574, 1996.

JANERO D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biology & Medicine, v. 9, p. 515-540, 1990.

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, v. 1(1), p. 2-25, 1970.

JOHNSON L.; DONALD L.; THOMPSON Jr; VARNER D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. Animal Reproduction Science, v. 105, p. 23-51, 2008.

JOHNSON L.; PETTY C. S.; NEAVES W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 25, p. 217-226, 1981.

JONES R.; LOPEZ K.H. *Human reproductive biology*, p. 67-83 4ª edição, 2014.

KERR J. B.; LOVELAND K. L.; O'BRYAN M. K.; KRETZER D. M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, p. 827-947, 2006.

KIMBARIS A.C.; KOLIOPOULOS G.; MICHAELAKIS A.; KONSTANTOPOULOU M.A. Bioactivity of *Dianthus caryophyllus*, *Lepidium sativum*, *Pimpinella anisum*, and *Illicium verum* essential oils and their major components against the west Nile vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, v. 111, p. 2403-2410, 2012.

KUMAR S.; PANDEY A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 36-42, 2013.

LACCOURREYE O.; WERNER A.; LACCOURREYE L.; BONFILS P. Benefits, pitfalls and risks of phytotherapy in clinical practice in otorhinolaryngology. *European Annals Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, vol. 134, p. 95-99, 2016.

LI H.; LI H-B.; ZHANG M.; YAN F.; ZHANG Z-X.; LI Z-L. Effect of apigenin on the reproductive system in male mice. *Health*, v. 2 (5), p. 435-440, 2010.

MABOGO D.E.N. *The Ethnobotany of Vhavenda*. M.Sc. Thesis. University of Pretoria. Pretoria, p. 394-408, 1990.

MARTINETI V.; TOGNARINI I.; AZZARI C.; SALA S. C.; CLEMATIS F.; DOLCI M.; LANZOTTI V.; TONELLI F.; BRANDI M. L.; CURIR P. Inhibition of in vitro growth and arrest in the G0/G1 phase of Hct8 line human colon cancer cells by Kaempferide triglycoside from *Dianthus caryophyllus*. *Phytotherapy Research*, v. 24, p. 1302-1308, 2010.

MATTA A. P. L. F. Efeitos do extrato aquoso da raiz de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl. (Ochnaceae) sobre testículos de camundongos suíços adultos. Viçosa - UFV, 2008. (Dissertação de mestrado)

MATTA A. P. L. F. Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos adultos. Viçosa – UFV, 2012. (Tese de doutorado)

MIRHOSEINI M.; MOHAMADPOUR M.; KHORSANDI L. Toxic effects of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) extract on mouse spermatogenesis. Journal Assisted Reproduction Genetics, v. 29, p. 457-461, 2012.

MOHAMMED M. J.; AL-BAYATI F. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Thymus kotschyanus* aerial parts and *Dianthus caryophyllus* flower buds. Phytomedicine, v. 16, p. 632-637, 2009.

MONTEIRO J. C.; PREDES F. S.; MATTA S. L. P.; DOLDER H. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of cyclosporine a on the testis. Anatomical Record, v. 291, p. 809-817, 2008.

NASCIMENTO L. S. Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa da Juçara (*Euterpe edulis* Martius) sobre a morfologia testicular de ratos adultos sadios e expostos ao cádmio. Viçosa- UFV, 2017 (Tese de doutorado)

NEVES A. C. Efeitos do açaí (*Euterpe edulis*) em testículo de ratos expostos ao acetato de chumbo: análise morfométrica e estrutural. Viçosa – UFV, 2016. (Dissertação de mestrado)

O'DONNELL L.; ROBERTSON K. M.; JONES M. E.; SIMPSON E. R. Estrogen and spermatogenesis. Endocrine Review, v. 22 (3), p. 289-318, 2001.

OLIVEIRA A. B.; LONGHI J. G.; ANDRADE C. A.; MIGUEL O. G., MIGUEL M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. Visão Acadêmica, p. 1-13, 2010.

OMINO E.A; KOKWARO J.O. Ethnobotany of Apocynaceae species in Kenya. Journal Ethnopharmacology v. 4, p. 167–180, 1993.

OPUWARI C. S.; MONSEES T. K. In vivo effects of *Aspalathus linearis* (rooibos) on male rat reproductive functions. Andrologia, v.46, p. 867-877, 2014.

OSHIO L. T. Efeito do extrato de *Ginko biloba* (EGb) sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos. Juiz de Fora – UFJF, 2012. (Dissertação de mestrado).

PAULA T. A. R.; COSTA D. S.; MATTA S.L.P. Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. Bioscience Journal, v. 18, p. 121-136, 2002.

PINA H. V.; SOUSA, K. H. F.; ONO, M. S. B.; TREVISAN, L.; BRAGA, V.A. O tratamento agudo com extrato hidroalcoólico DC-300 reduz a pressão arterial de ratos Wistar com hipertensão experimental. Anais da I Semana do Médico Veterinário da UFPB, 2009.

POOLEY E. Trees of Natal, Zululand and Transkei. Natal Flora Publications, Durban, p. 238-241, 1993.

RAKUAMBO N. C.; MEYER J. J. M.; HUYSER C.; MDLALOSE S. P.; RAIDANI T. G. In vitro effect of medicinal plants used to treat erectile dysfunction on smooth muscle relaxation and human sperm. Journal Ethnopharmacology, v. 105, p. 84-88, 2006.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. Nitric Oxide: Biology Chemistry, v. 6 (2), p. 178-185, 2002.

RUSSELL L. D.; ETTLIN R. A.; HIKIM A. P. S.; CLEGG E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Chapter 1, p. 1-40, 1990.

SHARMA R.; AGARWAL A. Spermatogenesis: an overview. Sperm Chromatin , p. 19-44, 2011.

SHARPE R. M. Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction* . New York NY: Raven Press, p. 1363-1434, 1994.

SILVA J. Histomorfometria testicular em camundongos expostos à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). Viçosa – UFV, 2017. (Dissertação de mestrado)

STANTON P. G. Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 59, p. 166-173, 2016.

TAHTAMOUN L. H.; AL-KHATEEB R. A.; ABDELLATIF R. N.; AL-MAZAYDEH Z. A.; YASIN S. R.; AL-GHARABLI S.; ELKARMI A. Z. Anti-spermatogenic activities of *Taraxacum officinale* whole plant and leaves aqueous extracts. *Veterinary Research Forum*, p. 89- 97, 2016.

TERAHARA N.; YAMAOUCHI M.A.; TAKEDA K.; HARBORNE J.B.; SELFI R. Anthocyanins acylated with malic acid in *Dianthus caryophyllus* and *D. deltoides*. *Phytochemistry*, v. 25, p. 1715-1717, 1984.

TREMELLEN K. Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, v.14 (3), p. 243-258, 2008.

TREVISAN L. F. A.; SOUZA R. V.; BERTOLUCCI S. K. V.; RODRIGUES O. G. Tratamento alternativo em gatos acometidos por Dituif. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v.68 (4), p. 1099-1103, 2016.

VAN WYK B. E.; GERICKE, N. *People's Plants: A Guide to Useful Plants*. Briza Publications, Pretoria, p. 215-234, 2000.

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), v. 31, p. 31-44, 1998.

WATT J. M.; BREYER-BRANDWIJK M. G. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. Livingstone Edinburgh, p. 119-131, 1962.