

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**LUIZ PEDRO DE SOUZA COSTA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Athenaea  
velutina* (SENDTN.) D'ARCY (SOLANACEAE) SOBRE PARÂMETROS  
TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE RATOS WISTAR**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

**LUIZ PEDRO DE SOUZA COSTA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Athenaea  
velutina* (SENDTN.) D'ARCY (SOLANACEAE) SOBRE PARÂMETROS  
TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE RATOS WISTAR**

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*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

Coorientador: João Paulo Viana Leite

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

C837e  
2020  
Costa, Luiz Pedro de Souza, 1993-  
Efeito da exposição subcrônica do extrato etanólico de  
*Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy (Solanaceae) sobre  
parâmetros testiculares e epididimários de ratos Wistar / Luiz  
Pedro de Souza Costa. – Viçosa, MG, 2020.

76 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.60-73.

1. Solanaceae. 2. Morfometria. 3. Stress oxidativo.  
4. Toxicologia reprodutiva. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 583.952

**LUIZ PEDRO DE SOUZA COSTA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Athenaea  
velutina* (SENDTN.) D'ARCY (SOLANACEAE) SOBRE PARÂMETROS  
TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE RATOS WISTAR**

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*.

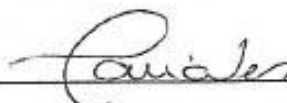
APROVADA: 18 de setembro de 2020.

Assentimento:



---

Luiz Pedro de Souza Costa  
Autor



---

Mariana Machado Neves  
Orientadora

**Dedico este trabalho a Deus,  
minha mãe e professores que  
tanto auxiliaram neste crescimento.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus pelo fortalecimento e consolo durante toda essa caminhada, por abençoar todo o processo para que pudesse realizar este sonho.

A minha mãe/pai Maria Gecilda que durante minha vida toda sempre me apoiou em todos os meus sonhos e projetos. Em meio a dificuldade, nunca deixou faltar nada e sempre me incentivou aos estudos, mesmo que ela nem tenha a pré-escola, sempre foi a maior incentivadora e meu maior exemplo de ser humano.

Ao pai, João Azevedo, apesar de não estar mais presente, sempre torceu para o meu sucesso e sempre falava com orgulho do filho que tinha.

Aos meus irmãos, Verônica Sabrina, Raimundo Simão, João Filho, Elen Cintia, Elmara e, meu eterno irmão, Antônio Marcos, por sempre darem apoio, por mais distante que sejamos, acredito que sempre torceram por mim.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Queiros Fialho, minha orientadora de graduação, que tanto incentivou, apoiou e contribuiu para que eu pudesse estar aqui. É um exemplo de professora, pesquisadora e mulher, no qual posso ter como espelho.

Aos Professores, Dr. José Fernando Marques Barcellos, Dr<sup>a</sup> Rosilene Gomes Ferreira, Dr<sup>a</sup> Jerusa Araújo Quintão e Dr<sup>a</sup> Lorena Nacif por todo apoio moral e financeiro que proporcionaram antes e durante minha estadia inicial em Viçosa, sem eles eu não estaria aqui realizando este sonho.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Machado Neves por ter me aceitado como orientando sem ao menos me conhecer previamente. Obrigado pela oportunidade, pelas conversas, pelos ensinamentos e, principalmente, pelas correções, sem isso não teria crescido durante este processo.

Aos amigos Kimberly Beira-Mar, Amanda Amaral, Gabrielly Baraúna e Rafael Brito, pela amizade, companheirismo e compartilhamento de todas as alegrias e aflições. Não existe modo para descrever como essas amizades são importantes para mim.

As amigas Patrícia Simas, Mayla Leão, Maria Auxiliadora e Ruth Ferreira por todo carinho e apoio moral. Sem vocês não estaria aqui.

A minha mãe de Viçosa, dona Maria Nilza e seus filhos, meus irmãos do coração, Rafael e Talita que me adotaram e fizeram os meus dias mais felizes. Obrigado por todas as conversas, apoio e choros juntos.

As amigas que Viçosa trouxe no primeiro dia, Ana Paula e Jullie Anne. Com essas meninas meus dias se tornaram mais brilhantes e o processo na pós-graduação tornou-se mais leve.

Ao meu querido amigo John Lennon, pelo apoio nas análises e moral durante todo o período de experimento. Obrigado principalmente pela amizade e por sempre me ouvir.

A Jordana Luizi, pelo companheirismo durante todo o processo de coleta, extração e experimentação animal.

Aos parceiros de laboratório, Juliana (Juju), Arabela, Iara, Renner, Felipe e, em especial, Luiz Otávio por todo o auxílio prestado durante todo este processo.

Aos professores do laboratório de Biologia Estrutural, Sérgio da Matta, Clóvis Neves e Izabel Maldonado, por todo suporte, aprendizagem e conversas durante o período de experimento.

A Elizabeth Oliveira por toda ajuda na escrita, nas análises e por seus enormes e valorosos conselhos. A frase “expectativa baixa e esforço constante” marcou minha trajetória.

A amiga Diene France por toda ajuda com as análises de bancada e estatística. Não tenho palavras para descrever o tanto que ela ajudou na hora em que mais precisei, obrigado por sua amizade e carinho.

Ao Luiz Ladeira e Daniel Bastos por todo suporte nas análises estatística e valiosos conselhos.

Aos amigos Matheus, Iury e Daisy por toda ajuda nas análises morfométricas.

A Jamile Fernanda pelo auxílio na montagem das pranchas e pela valiosa amizade que levarei para a vida.

As amigas Lídia Dourado e Jenifer Ramos por todo apoio, carinho e conversas que ajudaram durante o processo na pós-graduação.

Ao meu coorientador Prof. Dr. João Paulo e toda sua equipe do BIOPROS por todo suporte em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Leandro Licursi por conceder seu laboratório e materiais para a realização das análises bioquímicas.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV e seus funcionários e professores, principalmente ao Departamento de Biologia Geral (DBG), por todo apoio e suporte.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, especialmente a secretaria do programa; Beth, por toda a ajuda e suporte durante este processo.

À agência de fomento CAPES pelo consentimento da bolsa, sem a qual este projeto não teria sido desenvolvido.

A todos os amigos que fiz em Viçosa que de certa forma contribuíram para meu crescimento pessoal e/ou profissional.

*Eu sou a videira e vós os ramos; o que permanece em Mim e Eu nele,  
este dá muitos frutos; porque separados de Mim nada podeis fazer.*

*(João 15:5)*

## RESUMO

SOUZA-COSTA, Luiz Pedro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2020. **Efeito da exposição subcrônica do extrato etanólico de *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) sobre parâmetros testiculares e epididimários de ratos Wistar.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientador: João Paulo Viana Leite.

O uso de plantas com propriedades terapêuticas tem mostrado efeito positivo sobre funções reprodutivas. O gênero *Athenaea* (Solanaceae) é encontrado principalmente em regiões de Mata Atlântica. A espécie *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy tem se mostrado promissora em estudos recentes como fitoterápico em modelo patológico, sendo seu efeito associados aos compostos vitanolídeos encontrados no extrato. No entanto, não se tem estudos sobre sua ação na reprodução, assim como seus possíveis efeitos toxicológicos, principalmente sobre órgãos reprodutivos. Assim, o presente trabalho avaliou os efeitos do extrato etanólico da folha de *A. velutina* sobre órgãos reprodutores masculinos de ratos Wistar. Animais adultos tratados por 28 dias foram divididos em seis grupos experimentais (n=5/grupo): controle, tratados com PBS e 1% de DMSO; e os tratamentos com 250, 500 e 1000 mg/kg do extrato de *A. velutina* (G250, G500 e G1000). Dois grupos foram mantidos por mais 14 dias, sem o tratamento, para avaliação da ocorrência tardia de possíveis efeitos toxicológicos e foram denominados como: controle *recovery*, inicialmente tratados com PBS e 1% de DMSO; e G1000R, inicialmente tratados com 1000 mg/kg do extrato de *A. velutina*. O extrato de *A. velutina* não mostrou causar alterações em parâmetros clínicos e biométricos nos animais tratados. Em relação ao testículo, a avaliação microscópica evidenciou vacúolos na base e ápice do epitélio seminífero de alguns animais do grupo G1000. Observou-se alterações em parâmetros morfométricos tubulares, como aumento no percentual e volume da túnica própria, na altura do epitélio e no índice epitéliosomático, assim como diminuição no percentual e diâmetro do lúmen dos animais dos grupos G500 e G1000. Os componentes intersticiais não apresentaram alterações nos animais tratados com *A. velutina*. A estereologia e morfometria das células de Leydig mostrou aumento no diâmetro nuclear e em seus componentes nos animais dos grupos G500 e G1000. A histologia e morfometria do epidídimo dos animais tratados com extrato de *A. velutina* não apresentou alterações significativas. Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, nenhuma alteração foi observada nos animais tratados. Por outro lado, o malondialdeído em animais dos grupos G250 e G500 teve sua concentração reduzida. Este trabalho mostrou que, apesar de algumas alterações estereológicas e morfométricas encontradas no testículo, o extrato de *A. velutina* não gerou toxicidade neste órgão, bem como no epidídimo. Pelo contrário, o extrato regulou

positivamente as concentrações de malondialdeído oriundas de processos oxidativos celulares, mostrando um efeito benéfico para a reprodução masculina.

**Palavras-chave:** Solanaceae. Morfometria. Estresse oxidativo. Toxicologia reprodutiva.

## ABSTRACT

SOUZA-COSTA, Luiz Pedro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2020. **Effect of subchronic exposure of the ethanolic extract of *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) on testicular and epididymal parameters of Wistar rats.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: João Paulo Viana Leite.

The use of plants with therapeutic properties has shown a positive effect on reproductive functions. The genus *Athenaea* (Solanaceae) is found mainly in Atlantic Forest regions. *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy has shown promise in recent studies as an herbal medicine in a pathological model, its effect being associated with the witanolide compounds found in the extract. However, there are no studies on its action on reproduction, as well as its possible toxicological effects, mainly on reproductive organs. Thus, the present work evaluated the effects of the ethanolic extract of *A. velutina* leaf on male reproductive organs of Wistar rats. Adult animals treated for 28 days were divided into six experimental groups (n=5/group): control, treated with PBS and 1% DMSO; and treatments with 250, 500 and 1000 mg/kg of *A. velutina* extract (G250, G500 and G1000). Two groups were maintained for another 14 days, without treatment, to assess the late occurrence of possible toxicological effects and were called: control recovery, initially treated with PBS and 1% DMSO; and G1000R, initially treated with 1000 mg/kg of *A. velutina* extract. *A. velutina* extract has not been shown to cause changes in clinical and biometric parameters in the treated animals. Regarding the testis, microscopic evaluation revealed vacuoles at the base and apex of the seminiferous epithelium of some animals in the G1000 group. Changes in tubular morphometric parameters were observed, such as an increase in the percentage and volume of the propria tunica, in the height of the epithelium and in the epithelosomatic index, as well as a decrease in the percentage and diameter of the lumen of animals in groups G500 and G1000. The interstitial components showed not changes in animals treated with *A. velutina*. The stereology and morphometry of Leydig cells showed an increase in the nuclear diameter and its components in animals in groups G500 and G1000. The histology and morphometry of the epididymis of the animals treated with extract of *A. velutina* did not present significant alterations. Regarding the activity of antioxidant enzymes, not changes were observed in the treated animals. On the other hand, malondialdehyde in animals in groups G250 and G500 had its concentration reduced. This work showed that, despite some stereological and morphometric changes found in the testis, the extract of *A. velutina* did not generate toxicity in this organ, as well as in the epididymis. On the contrary, the extract positively regulated the concentrations of malondialdehyde from cellular oxidative processes, showing a beneficial effect for male reproduction.

**Keywords:** Solanaceae. Morphometry. Oxidative stress. Reproductive toxicology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental.....	19
Figura 2 Vitanolídeos encontrados no extrato da folha de <i>A. velutina</i> .....	20
Figura 3 Efeito da administração por via oral do extrato de <i>A. velutina</i> em ratos Wistar sobre o consumo de água e ração.....	37
Figura 4 Proporção de túbulos seminíferos patológicos de ratos Wistar tratados por 28 dias via oral do extrato de <i>A. velutina</i> .....	40
Figura 5 Secções histológicas dos testículos de ratos Wistar adultos.....	41
Figura 6 Secções histológicas do epidídimo de ratos Wistar adultos.....	42
Figura 7 Enzimas antioxidantes e marcadores relacionadas ao quadro de estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos, testículo e epidídimo de ratos Wistar adultos submetidos ao extrato etanólico de <i>A. velutina</i> por 28 dias.....	52
Figura 8 Enzimas antioxidantes e marcadores relacionadas ao quadro de estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos, testículo e epidídimo de ratos Wistar adultos submetidos ao extrato etanólico de <i>A. velutina</i> por 28 dias observado por mais 14 dias.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros biométrico corporal e dos órgãos reprodutores masculinos dos ratos Wistar tratados com <i>A. velutina</i> .....	38
Tabela 2	Percentual e volume dos componentes tubulares de ratos Wistar tratados com extrato etanólico de <i>A. velutina</i> .....	43
Tabela 3	Morfometria de túbulo seminífero de ratos Wistar tratados com extrato etanólico de <i>A. velutina</i> .....	44
Tabela 4	Percentual e Volume dos componentes do interstício de ratos Wistar tratados com de extrato etanólico de <i>A. velutina</i> .....	46
Tabela 5	Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de ratos Wistar tratados com extrato etanólico de <i>A. velutina</i> .....	47
Tabela 6	Morfometria do túbulo epididimário de ratos Wistar tratados com extrato etanólico de <i>A. velutina</i> .....	49

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. <i>Objetivo geral</i> .....	16
2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
3.1 – Fitoterápico e uso farmacológico.....	16
3.2 – <i>Athenaea velutina</i> (Sendtn.) D'Arcy .....	19
3.3 – Histofisiologia testicular .....	22
3.3 – Histofisiologia epididimária .....	24
3.4 – Planta e órgãos reprodutivos.....	26
3.5 – Estresse oxidativo na reprodução.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 – Dados randômicos e coleta das folhas de <i>A. velutina</i> .....	30
4.2 – Preparo do extrato etanólico da <i>A. velutina</i> .....	30
4.3 – Delineamento experimental .....	31
4.4 – Coleta do material biológico e biometria testicular .....	32
4.5 – Processamento histológico dos órgãos reprodutores .....	32
4.7 – Morfometria testicular .....	33
4.8 – Morfometria epididimária.....	34
4.9 – Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo .....	35
4.10 – Análise estatística .....	37
5. RESULTADOS .....	37
5.1 – Condições clínicas e consumo de água e ração .....	37
5.2 – Massa corporal e dos órgãos reprodutivos.....	37
5.3 – Morfometria testicular .....	44
5.2 – Morfometria intersticial .....	47
5.3 – Morfometria epididimária.....	50
5.4 – Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo .....	52
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	60
8. REFERÊNCIAS .....	60
9. ANEXO (S).....	74

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais possuem propriedades terapêuticas que podem aliviar sintomas e tratar doenças, apesar de ocasionalmente apresentarem efeitos adversos (Trojan-Rodrigues et al., 2012). Para uma planta medicina se tornar um medicamento fitoterápico é necessária a realização de pesquisas que busquem identificar os componentes químicos bioativos visando a padronização do extrato, ensaios de segurança e de comprovação de eficácia terapêutica (Tribess et al., 2015).

Os compostos fitoquímicos de plantas medicinais podem atuar positivamente sobre as funções reprodutivas masculinas (Farombi et al., 2013). A busca por fitoterápicos que melhorem os aspectos reprodutivos tem se tornado fonte de diversos estudos, pois os compostos fitoquímicos de origem vegetal podem alterar positivamente as taxas de fertilidade e regular as atividades dos componentes enzimáticos testiculares (Dias et al., 2019; Mouro et al., 2020). Apesar dos efeitos benéficos, algumas plantas apresentam efeitos adversos na reprodução masculina, podendo afetar negativamente a produção dos espermatozoides e comprometer as funções testiculares e epididimárias (Dias et al., 2019). Por isso, existe a necessidade de avaliar os possíveis efeitos positivos e negativos de uma planta sobre a reprodução masculina.

Dentre as plantas com potencial afrodisíaco e na reprodução, algumas espécies pertencentes à família Solanaceae merecem atenção, principalmente aquelas do gênero *Withania* spp. que já tiveram suas propriedades farmacológicas e afrodisíacas descritas na literatura (Kumar et al., 2015a). Embora essas espécies sejam promissoras para as funções reprodutivas, muitas delas não são encontradas no Brasil. Assim, existe a necessidade da busca por plantas alternativas que possam ser utilizadas para a melhora da reprodução (Da Silva et al., 2012). *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy faz parte do gênero *Athenaea* que pertence à subtribo *Withaninae*, sendo descritas cerca de 12 espécies encontradas principalmente na Mata Atlântica (Stehmann et al., 2015; Zamberlan et al., 2015; Kuhlmann, 2018). Apesar de ser pouco conhecida pela ciência, *Athenaea velutina* tem se mostrado promissora em estudos farmacológicos, principalmente por apresentar compostos bioativos pertencentes à classe de esteroides vitanolídeos, similares à espécie *W. somnifera*, conhecida pela medicina Ayurvédica, como ginseng indiano (Olmstead et al., 2008).

Em estudo recente, o extrato de *A. velutina* diminuiu número de colônias de melanoma induzidos nos pulmões de camundongos *Black*, sendo sua atividade associada aos vitanolídeos (Almeida, 2019). Outro estudo sugere que o extrato etanólico da folha de *A. velutina*, cujo os

marcadores fitoquímicos são os vitanolídeos, não causou alterações clínicas sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos hepáticos de ratos Wistar (Prazeres, 2020). Ainda, os vitanolídeos também foram descritos no extrato da folha de *Atheneae fasciculata* e tiveram atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *L. amazonenses* (Lima et al., 2018).

Os vitanolídeos são metabólitos secundários esteroides oxigenados e são bastante estudados, obtidos a partir dos gêneros *Withania* e *Physalis* (Kumar et al., 2015; Huang et al., 2019). Diversos estudos farmacológicos têm sido realizados com vitanolídeos, sendo que esses compostos apresentaram atividades anticarcinogênica, anti-inflamatória, antidepressiva, hepatoprotetora e imunomoduladora (Jayanthi et al., 2012; Malik et al., 2013; Yang et al., 2017; Li et al., 2017; Kumar et al., 2019).

Apesar de não existirem estudos sobre os efeitos de *A. velutina* na reprodução masculina, é possível que a mesma possua efeitos positivos nos órgãos reprodutivos, já que a literatura mostra que *Withania somnifera* (L.) Dunal, pertencente à mesma subtribo de *A. velutina*, é utilizada como um fitoterápico afrodisíaco na Ásia e na África (Olmstead et al., 2008). Estudos com extrato de *W. somnifera* descrevem um aumento na concentração de espermatozoides em homens inférteis. Os estudos ainda mostraram que há um aumento nas concentrações séricas de testosterona e hormônio luteinizante (LH), além disso, foi observado uma melhora significativa na qualidade e motilidade espermática e nas concentrações de marcadores de estresse oxidativo (Ahmad et al., 2010; Rajashree et al., 2011; Ambiye et al., 2013; Kaspate et al., 2015).

Para que uma planta seja utilizada como fitoterápico na reprodução, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) adverte que pesquisas de toxicidade devem ser avaliadas sobre doses repetidas em órgãos reprodutores (Anvisa, 2013). Diante do exposto, observando os estudos com as espécies da família Solanaceae e de alguns dados pré-existentes sobre a planta, é possível que *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy não seja tóxica aos órgãos reprodutivos e que a mesma possa ser utilizada como fitoterápico. Assim, foram realizados ensaios pré-clínicos para verificação dos possíveis efeitos toxicológicos do extrato de *A. velutina* sobre a reprodução de ratos machos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos do extrato etanólico da folha de *A. velutina* sobre órgãos reprodutores masculinos de ratos Wistar.

### 2.2. *Objetivos específicos*

- Verificar o efeito do extrato etanólico de *A. velutina* sobre os parâmetros biométricos de ratos durante e após o tratamento;
- Avaliar se o extrato etanólico de *A. velutina* altera parâmetros estereológicos e morfométricos testiculares e epididimários;
- Averiguar a presença de possíveis danos morfológicos testiculares e epididimários que tenham sido causados pelo extrato etanólico de *A. velutina*;
- Verificar se o extrato etanólico de *A. velutina* altera a atividade das enzimas antioxidantes que atuam no processo de estresse oxidativo, bem como outros indicadores de dano oxidativo nos testículos e epidídimos de ratos.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 – Fitoterápico e uso farmacológico

O uso de plantas para fins medicinais surgiu na antiguidade pelas civilizações da China, Índia, Egito e Grécia. Atualmente, é assumido que a maior parte dos medicamentos existentes foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, sendo que em apenas 38 anos diversos medicamentos anticarcinogênicos e antidiabéticos, por exemplo, testados e aprovados foram derivados a partir desses produtos (Newmann & Gragg, 2020).

As plantas podem ser usadas de diferentes formas para a promoção da saúde, podendo ser citadas seu uso de forma mais simples, como tratamento tópico, e seu beneficiamento pelas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica (Lorenzi & Matos, 2008). Porém, o uso de plantas com finalidade terapêutica sem respaldo científico é uma prática perigosa e um obstáculo para a implantação da fitoterapia. Por isso, é importante a abordagem científica para comprovar a eficácia de uma planta como fitoterápico (Beltrán-Rodríguez et al., 2014).

A seleção de uma planta para pesquisa farmacológica é baseada em quatro abordagens principais: quimiotaxonômica, etológica, etnodirigida e randômica. A abordagem quimiotaxonômica constitui-se na seleção de espécies de uma família ou gênero, onde haja conhecimento fitoquímico de pelo menos uma espécie do grupo (Misra & Srivastava, 2016).

A abordagem etológica é baseada nos estudos comportamentais de animais, como os primatas, sob o consumo de determinada planta (Gaoue et al., 2017). A abordagem etnodirigida é baseada na seleção de espécies de acordo com a indicação de uso por grupos populacionais específicos, essa abordagem é conhecida também como etnofarmacológico, que parte do princípio do conhecimento tradicional (Gaoue et al., 2017). As investigações randômicas envolvem a coleta ao acaso de plantas para triagens fitoquímicas e farmacológicas, no entanto, apesar de ser uma abordagem aleatória, essa técnica aplica-se de forma criteriosa (Almeida et al., 2020).

Para que uma planta se torne insumo farmacêutico ativo de fitoterápico é necessário que além de ser conhecido os compostos relacionados à atividade biológica, ter pesquisa de segurança e de comprovação terapêutica. Essas atividades estão diretamente relacionadas aos metabólitos secundários que são produzidos conforme as condições ambientais em que a planta cresce, tais como temperatura, precipitação, sazonalidade e o tipo de solo (Bianchini, 2011). Quando a planta é exposta a uma situação de estresse ou afetada por algum patógeno, ela ativa sistema de defesa química e passa a sintetizar moléculas conhecidas como metabólitos secundários. Essas moléculas, que também pode ser encontrada em bactérias e fungos, são essenciais para a sobrevivência da planta, desempenhando um papel importante em sua fisiologia e metabolismo. Para os seres humanos, esses metabólitos podem ser utilizados no tratamento de doenças (Taiz et al., 2017; Narsing Rao et al., 2017).

Vários metabólitos secundários de origem vegetal apresentam grande importância para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (Guerriero et al., 2018; Wink, 2018). Os metabólitos secundários podem ser categorizados em quatro classes principais, sendo os compostos fenólicos, terpenoides, compostos nitrogenados e compostos sulfatados (Vizzotto et al., 2010; Ahmed et al., 2017).

Muitos destes compostos extraídos de plantas já possuem atividades farmacológicas bem descritas na literatura e alguns já são utilizados como princípios ativos de medicamentos, constituindo assim, os fitofármacos. Compostos contendo nitrogênio, como os alcaloides, podem apresentar atividades leishmanicida, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticarcinogênica, anti-HIV e outras atividades farmacológicas (Santos et al., 2016; Moreira et al., 2018). Os flavonoides, pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, possuem diversas atividades já descritas como antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, analgésica e outras (Sangeetha et al., 2016). Compostos contendo sulfato, como lectinas e defensinas, por exemplo, possuem atividades imunomoduladoras, antimicrobiana e antiviral,

as quais são muito importantes para o sistema imunológico (Holly et al., 2017; Jandú et al., 2017).

Os compostos vitanolídeos fazem parte do grupo dos terpenoides, podendo ser definidos como lactonas esteroidais, sendo os principais compostos quimiotaxonômicos encontrados na família Solanaceae (Sang-Ngern et al., 2016; Sathiyabama & Parthasarathy, 2018). Estudos com os vitanolídeos mostram ação supressora de linhagens celulares de carcinoma (Cao et al., 2015; Sun et al., 2016), atividade anti-inflamatória com inibição da produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico sintase inorgânico (iNOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) (Li et al., 2017), efeito antidiabético (Liu et al., 2010), atividade imunomoduladora, redução da produção de NO em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- $\gamma$  (Soares et al., 2003), dentre outras atividades farmacológicas.

Os vitanolídeos possuem grande importância econômica, seus estudos têm sido baseados sobretudo nos gêneros da família Solanaceae, sendo os principais *Withania* e *Physalis*. (Kumar et al., 2015; Huang et al., 2019). Vitanolídeos extraídos de *P. pubescens* mostraram efeitos na supressão de quatro linhas celulares de carcinoma de células renais humanas (Chen et al., 2016). Efeitos antidiabéticos também foram descritos na espécie *P. alkekengi*, em que a planta se mostrou eficiente na redução das concentrações da glicose, do estresse oxidativo e na supressão da atividade da  $\alpha$ -glucosidase (Hu et al., 2018). Além disso, atividades farmacológicas como imunorregulação, antimicrobiana, anti-inflamatória, tripanossomicida e leishmanicida foram descritas para o gênero *Physalis*, todas associadas aos vitanolídeos (Huang et al., 2019).

A raiz da planta *W. somnifera* é utilizada como suplemento alimentar para idosos e gestantes. Em modelo animal com Alzheimer auxiliou na estimulação da aprendizagem e da memória, forneceu defesa contra doenças e retardou o processo de envelhecimento (Dhanani et al., 2017). Além disso, os vitanolídeos extraídos de *W. somnifera* foram associados a atividade hipoglicemiante melhorando a capacidade de absorção da glicose, sendo considerados antidiabéticos (Gorelick et al., 2015). Outras atividades farmacológicas são associadas a essa espécie, como hepatoprotetora, antiepilética, anticarcinogênica, antidepressiva, antioxidante e imunomoduladora (Jayanthi et al., 2012; Patel et al., 2013; Soman et al., 2013; Malik et al., 2013; Ahmed et al., 2018; Kumar et al., 2019). Mesmo com todos os resultados dos trabalhos supracitados, ainda são necessários mais estudos sobre os

compostos vitanolídeos, principalmente aqueles encontrados em espécies endêmicas do Brasil.

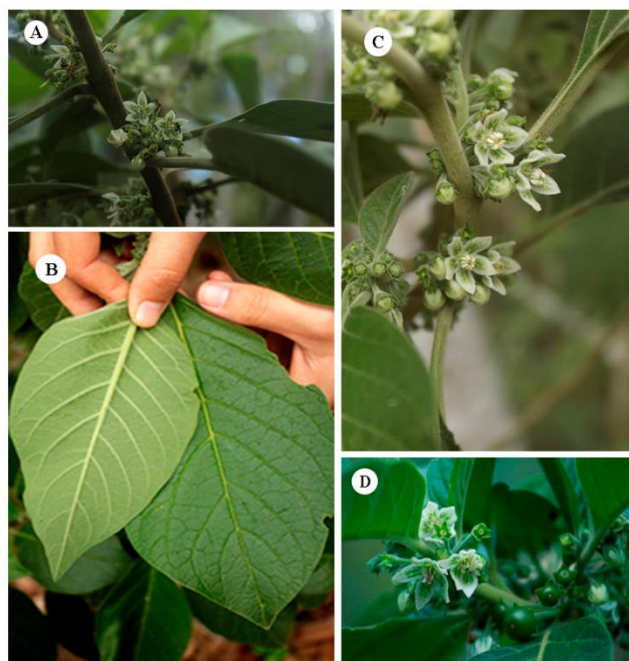
### 3.2 – *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy

As plantas com potencial farmacológico encontradas na Mata Atlântica necessitam de estudos mais detalhados acerca de suas propriedades medicinais. Diversas espécies de plantas têm grande potencial terapêutico, podendo ser importantes para a atenção primária à saúde (Tribess et al., 2015; Gomez et al., 2016).

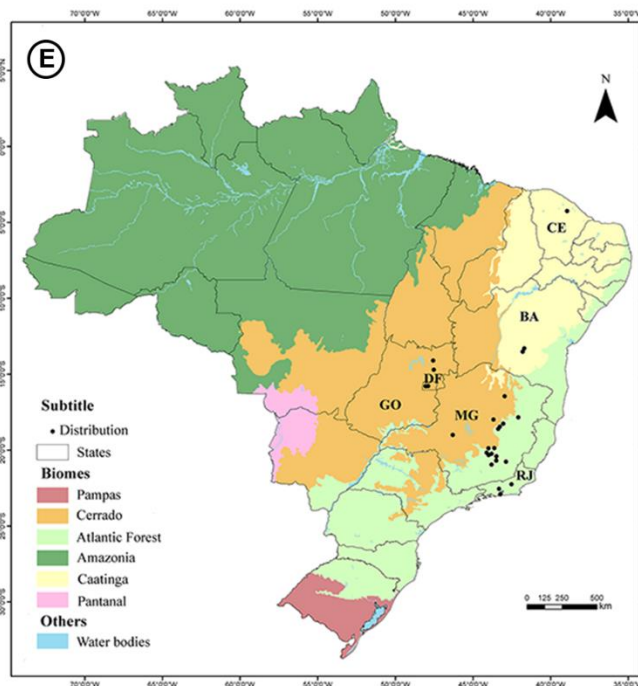
A família Solanaceae é composta por 97 gêneros, com cerca de 2700 espécies divididas em 9 subfamílias que são subdivididas em tribos, sendo várias espécies descritas com potencial farmacológico (Olmstead et al., 2008; Shah et al., 2013). Dentre os gêneros, existe o *Athenaea*, o qual contém 12 espécies, encontradas principalmente nas regiões sul e sudeste Brasil. Dentre essas espécies, existe *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy, nome legítimo e aceito para a nomenclatura taxonômica anterior *Aureliana velutina* Sendtn., que para a ser uma sinonímia (Rodrigues et al., 2019).

A *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy, conhecida como jurubeba-de-morcego, faz parte da subtribo Withaninae, da qual diversas plantas se destacam pela sua notória importância econômica para fins alimentícios, ornamentais ou farmacológicos (Zamberlan et al., 2015; Kuhlmann, 2018; Rodrigues et al., 2019). As características morfológicas de *A. velutina* são caule cilíndrico (Figura 1A) com tricomas simples. As folhas são acuminadas no ápice e atenuadas na base (Figura 1B). As corolas apresentam manchas verdes (Figura 1C). Os frutos apresentam coloração esverdeada quando imaturo e verde-amarelado quando maduro (Figura 1D) (Carvalho et al., 2001). Entre os domínios fitogeográficos, *A. velutina* é encontrada predominantemente na Mata Atlântica e Cerrado (Figura 1E).

## Características morfológicas

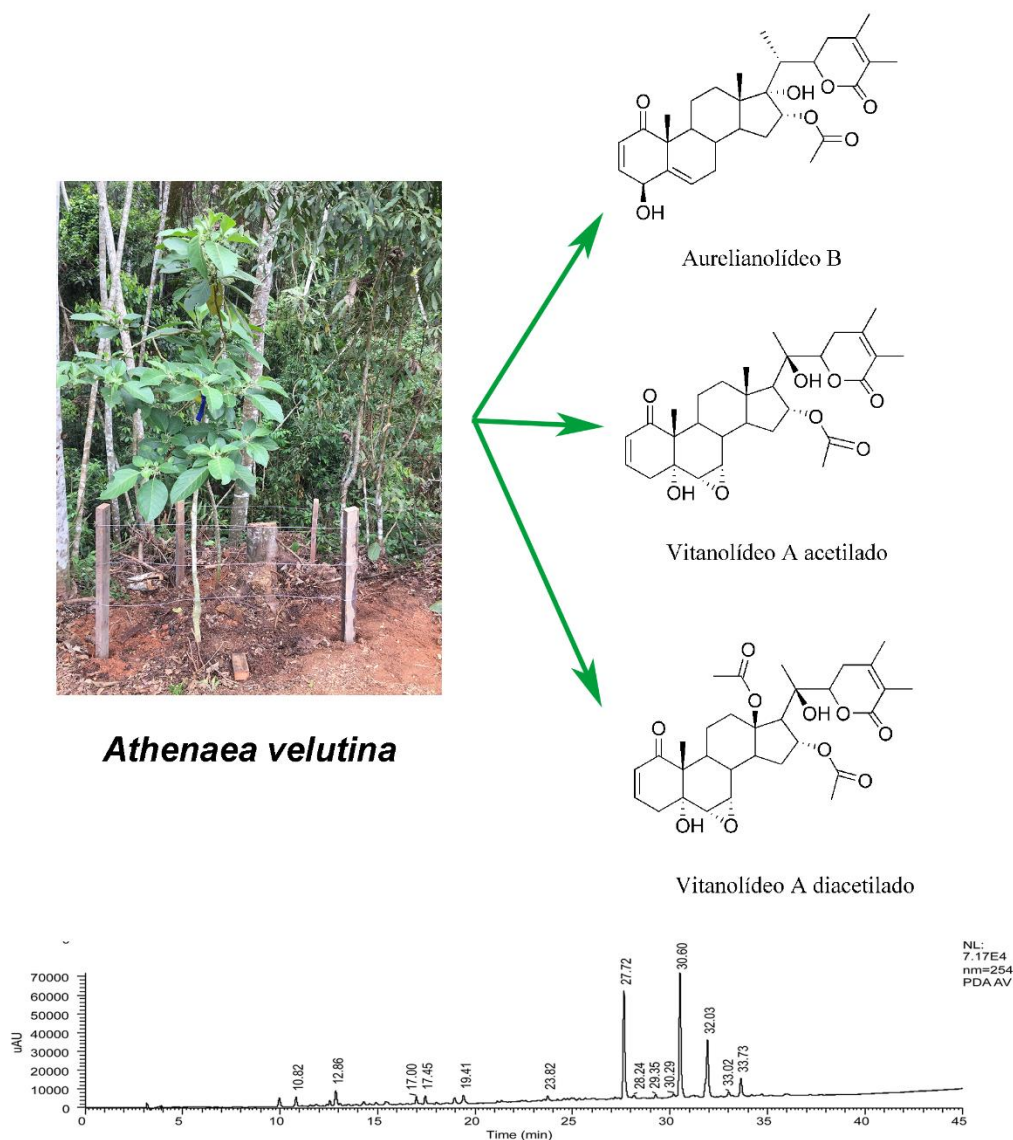


## Distribuição geográfica



**Figura 1.** *Athenaea velutina* (indivíduo encontrado na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA)). Imagens: Alisson A. Almeida.

A espécie de *Athenaea velutina* é pouco estudada em relação ao seu perfil fitoquímico e farmacológico. Apenas recentemente seu perfil fitoquímico foi analisado por Almeida (2019) e Prazeres (2020), sendo o vitanolídeo A acetilado, o aurelianolídeo B e o vitanolídeo diacetilado os componentes majoritários (Fig. 2). Estes estudos comprovam outros trabalhos que trouxeram a elucidação do perfil fitoquímico da espécie *Athenaea fasciculata* (Vell) (Almeida-Lafeté et al., 2010; Lima et al., 2018).



## Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

**Figura 2.** Vitanolídeos encontrados no extrato da folha de *A. velutina*. Prazeres (2020).

O perfil citotóxico de macrófagos J774 foi avaliado por Lima et al. (2018), os autores observaram atividade citotóxica significativa do vitanolídeo A e aurelianólídeo B. Almeida (2019) utilizando extrato de *A. velutina* e avaliando a atividade antimelanoma observaram resultados positivos na diminuição dos tumores. Além disso, o estudo de Prazeres (2020) mostrou que o extrato de *A. velutina* não é tóxico quanto aos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos hepáticos em modelo animal. Apesar dos estudos citados, a literatura ainda é escassa em relação ao potencial farmacológico de *A. velutina*, havendo necessidade de mais estudos.

### 3.3 – Histofisiologia testicular

Os testículos são órgãos responsáveis pela produção do gameta masculino (espermatozoide) e do hormônio testosterona, além disso, tem a função exócrina e endócrina, as quais mantêm a função reprodutiva e as características sexuais secundárias (Russell & França, 1995). É um órgão envolto externamente por uma cápsula conhecida como túnica albugínea, a qual possui coloração tendendo ao branco, sendo constituída por tecido conjuntivo denso (Griswold, 2015). A partir dessa cápsula, septos fibrosos estendem-se para o interior do órgão até o mediastino, subdividindo o testículo em lóbulos. O testículo é subdividido em dois compartimentos: intersticial, constituído por células intersticiais (de Leydig), e tubular, constituído por células que fazem parte da espermatogênese (Sharpe, 1994).

Os túbulos seminíferos são revestidos pela túnica própria, que contém elementos acelulares e as células mioides, que possuem características de células musculares lisas e participam do movimento contrátil do túbulo seminífero e dão suporte estrutural às células do epitélio seminífero (Ross & Pawlina, 2016; Rooij, 2017). O epitélio seminífero é constituído por duas populações de células, são essas as células germinativas e as células de Sertoli (células somáticas) (Amann, 2008). O epitélio seminífero é subdividido em dois compartimentos, um contendo as espermatogônias e os espermatócitos primários em pré-leptóteno (ambiente basal) e o outro contendo os espermatócitos primários e secundários e espermátides em diferentes fases da espermiogênese (ambiente adluminal) (Meistrich & Hess, 2013; Griswold, 2015; Morais et al., 2016).

As células de Sertoli são células epiteliais colunares altas, estendem-se desde a base até o lúmen dos túbulos seminíferos, sendo o núcleo mais evidente, pois é grande e capaz de mudar de forma através do ciclo do epitélio seminífero, geralmente exibindo profundas invaginações no envoltório nuclear (Hess & Vogl, 2015; França et al., 2016). Suas principais funções são a formação da barreira formado por células de Sertoli, que é responsável pela proteção das células germinativas controlando a passagem de moléculas e células do sistema imunológico; suporte estrutural e nutricional às células germinativas; fagocitose de corpos residuais e de células germinativas degeneradas; produção de fluidos testiculares e espermiação e a produção e liberação de fatores regulatórios. Além disso, as células de Sertoli possuem importante papel na manutenção da espermatogênese (Griswold, 2015; Oliveira & Alves, 2015; França et al., 2016).

A espermatogênese é constituída por três fases, sendo a primeira fase chamada de proliferativa, na qual ocorre a multiplicação de espermatogônias por mitose; a segunda de fase meiótica, a qual caracteriza-se pela recombinação e segregação do material genético; e a terceira fase é denominada de espermiogênese, na qual ocorre a citodiferenciação das espermátides arredondadas em espermatozoides (Chiarini-Garcia et al., 2003; O'Donnell, 2014; Nihi et al., 2017).

Outro compartimento importante é o interstício, que é constituído por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população de células. As principais células são os fibroblastos, os macrófagos e as células de Leydig, sendo estas responsáveis pela produção e secreção da testosterona (Ross & Pawlina, 2016).

As células de Leydig possuem núcleo de formato arredondado ou poligonal, normalmente bem evidente e citoplasma rico em retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias, isso se deve à sua atividade esteroidogênica. Elas encontram-se na região intersticial testicular, tendo como principal função a produção de testosterona, a partir da conversão do colesterol em pregnenolona, para a regulação parácrina da espermatogênese no testículo e para os vários processos endócrinos sistêmicos, androgênicos e anabólicos, fora do testículo (Teerds & Huhtaniemi, 2015; Wang et al., 2017).

A linhagem de células de Leydig adulta passa por quatro estágios de diferenciação durante seu processo de maturação: células-tronco Leydig (CTLs), células progenitoras de Leydig (CPLs), células imaturas de Leydig (CILs) e células adultas de Leydig (CALs), e na fase adulta são responsáveis pela produção de testosterona e manutenção da função reprodutiva masculina (Chen et al., 2009).

Para que o processo espermatogênico ocorra é necessário que determinados hormônios regulem as funções das células de Sertoli e das células de Leydig, esses hormônios são o FSH (hormônio folículo estimulante) e o LH (hormônio luteinizante) (Ross & Pawlina, 2016). O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), produzido no hipotálamo, estimula a secreção de FSH e LH pela adeno-hipófise. A síntese da proteína ligante de andrógeno (ABP) produzida pela célula de Sertoli é estimulada pelo FSH e a produção de FSH é estimulada pelo hormônio ativina e regulada pelo hormônio peptídeo inibina, que são produzidas pela célula de Sertoli atuando através de um *feedback positivo* e *feedback negativo*, respectivamente (Hafez et al., 2004). Já o LH estimula a síntese de testosterona nas células de Leydig e a testosterona por sua vez atua na hipófise diminuindo a síntese de LH, ou até mesmo diminui a síntese de GnRH, por meio do *feedback negativo* (Saltzman et al., 2010).

Apesar de um controle rígido para o equilíbrio homeostático nos testículos, alguns fatores exógenos, por exemplo, moléculas químicas provenientes de plantas e/ou metais pesados, podem afetar negativamente as funções reprodutivas levando a um total desequilíbrio. Tais fatores podem alterar o peso do órgão, as proporções e diâmetros dos túbulos seminíferos e dos componentes intersticiais, podendo levar ao comprometimento da espermatogênese (Souza et al., 2016a; Dias et al., 2019).

### 3.3 – Histofisiologia epididimária

Quando os espermatozoides saem do testículo eles são imaturos e incapazes de fecundar o ócito. Para que essa fecundação ocorra é necessário que os espermatozoides adquiram motilidade e sejam capacitados, esses processos ocorrem nos compartimentos do epidídimo (Dacheux & Dacheux, 2014). O epidídimo consiste em um longo ducto em formato de meia-lua, altamente enovelado e contorcido, que conecta os canais eferentes ao ducto deferente, localiza-se na região superior e posterior do testículo. O epidídimo consiste em ductos eferentes, que ocupam o segmento inicial e a cabeça do epidídimo; e ducto do epidídimo, que ocupa o corpo e a cauda (Ross & Pawlina, 2016). Esta regionalização é baseada no estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência dos diferentes tipos celulares que compõem seu epitélio (Sullivan, 2004; Cornwall, 2009).

A microestrutura tecidual do epidídimo consiste em um epitélio pseudoestratificado colunar, cuja altura é diferente ao longo do ducto epididimário. O epitélio pseudoestratificado é formado por células denominadas de células principais, basais, apicais, estreitas, claras e fagócitos migratórios que eventualmente são encontrados no epitélio (França et al., 2005; Sullivan, 2004). Além disso, a região intersticial do epidídimo é constituída por uma camada muscular que fica ao redor do ducto, auxiliando no transporte dos espermatozoides; por tecido conjuntivo; vasos sanguíneos e células do sistema imunológico (Ross & Pawlina, 2016).

As células principais constituem 80% das células do epitélio e caracterizam-se por abundância de retículo endoplasmático rugoso (RER), Golgi e grânulos secretórios, o que reflete sua alta atividade exocítica, principalmente nas regiões da cabeça e do corpo, e atividade endocítica na região da cauda, promovendo a reabsorção de vários componentes do líquido epididimário (Zhou et al., 2018).

As células basais estão intimamente ligadas à membrana basal e às células principais. Elas possuem a capacidade de modificar a sua forma para ajustar o volume e a pressão luminal, o que caracteriza uma proteção da integridade estrutural do lúmen (Zhou et al., 2018). Além

disso, as células basais possuem a capacidade de estender projeções citoplasmáticas até o lúmen, além de poder atravessar a barreira da junção, auxiliando na defesa imunológica e na acidificação luminal via receptor de angiotensina II tipo 2 (Shum et al., 2008, 2014).

As células apicais possuem uma morfologia curta em forma de cone no lado luminal do epitélio. Ainda não existem muitos estudos em relação à sua função, mas sabe-se que elas possuem a capacidade de endocitose de moléculas do lúmen (Robaire et al., 2006; Kujala et al., 2007).

As células claras e estreitas possuem a mesma função endocítica das células principais na região caudal. Além disso, elas possuem atividade ATPásica, auxiliando na acidificação luminal via bombeamento de prótons, essa acidificação e a baixa concentração de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) auxiliam a manter os espermatozoides em estado de repouso durante sua maturação e armazenamento no epidídimo (Shum et al., 2011).

Distribuídos por todas as regiões do epidídimo, os fagócitos migratórios, por exemplo, células dendríticas e macrófagos, foram descritos como estando associados às células epiteliais epididimárias, dando suporte e capacidade de apresentação de antígenos (Da Silva et al., 2011; Shum et al., 2014).

O tempo de passagem do espermatozoide é crucial para a maturação, em média a passagem pelo ducto epididimário varia de 3 a 15 dias, dependendo da espécie (Cosentino e Cockett, 1986). Vários processos ocorrem durante esse período, como a inserção de proteínas na superfície espermática via epididimossomo, como proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e ricas em cisteínas (CRISPs), dentre outras. Essas proteínas conferem resistência e motilidade ao espermatozoide para que possam realizar a fecundação no oócito e sobreviverem ao sistema imunológico da vagina (Dacheux & Dacheux, 2014; Martin-DeLeon, 2015; Hu et al., 2018).

O transporte do espermatozoide pelo ducto epididimário é essencial para o processo de maturação espermática, uma redução no tempo de trânsito pode interferir neste processo, afetando a quantidade e a capacidade fértil dos espermatozoides disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002; Ross & Pawlina, 2016).

Apesar de todo o controle fisiológico e apesar de o epidídimo ser um órgão bastante resistente, compostos químicos podem comprometer as estruturas e funções desse órgão, o que leva a não capacitação dos espermatozoides, podendo causar infertilidade (Ghosal et al., 2013; Souza et al., 2016b).

### 3.4 – Planta e órgãos reprodutivos

Tem-se mostrado atualmente que vários fatores como obesidade, ansiedade e uso exagerado de medicamentos sintéticos podem interferir e aumentar os riscos de desenvolver problemas sexuais (Alok et al., 2013). Por outro lado, diversas plantas têm mostrado potencial farmacológico promissor relacionado a funções reprodutivas, regulando positivamente a estrutura tecidual testicular e as células espermáticas (Farombi et al., 2013).

Em relação aos efeitos de plantas sobre as funções reprodutivas, o testículo é o principal órgão afetado, por ter a maior sensibilidade a agentes xenobióticos. Foi observado em um estudo recente que a combinação de *Anacyclus pyrethrum* (AP) com *Tribulus terrestris* (TT) elevou significativamente as concentrações de testosterona, melhorando as funções reprodutivas sexuais. Além disso, houve aumento significativo do número de espermatogônias, espermátides, células de Leydig e células de Sertoli e na espessura do epitélio seminífero dos animais (Haghmorad et al., 2019).

O aumento no número de células de Leydig e células de Sertoli tem sido associado à elevação das concentrações hormonais (Machado-Neves et al., 2018). Um estudo baseado na dieta contendo sementes de *Mucuna pruriens* mostrou que as concentrações séricas de testosterona, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) foram aumentadas. Além disso, houve melhora da defesa antioxidante testicular e da qualidade do espermatozoide epididimário, sem que houvessem alterações degenerativas testiculares (Ashidi et al., 2019).

Embora as plantas possam trazer benefícios para as funções reprodutivas, algumas possuem efeitos colaterais sobre a reprodução masculina, principalmente sobre as funções testiculares (Qureshi et al., 2006). O estudo de Dias et al. (2019) com extrato de *Pfaffia glomerata* mostrou que o extrato da planta promoveu redução do número de espermátides residentes, o que levou a um prejuízo na produção de espermatozoides, além de anomalias morfológicas nos espermatozoides, o que acarretou em perda embrionária.

Outros estudos também mostraram efeitos deletérios de plantas sobre os testículos. Os efeitos observados foram vacuolização intraepitelial, redução da área das células de Sertoli e de Leydig, degeneração tubular, redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio, além de afetar negativamente a produção de espermatozoides (Mishra & Singh, 2005, 2009; Gupta et al., 2007).

O epidídimo, mesmo sendo resistente, também pode ser afetado por agentes externos. Um estudo com *Hypoxis hemerocallidea* mostrou um aumento da quantidade de

espermatozoides e na motilidade espermática, o que resultou na melhora na fertilidade dos animais tratados (Tiya et al., 2016). O extrato etanólico de *Abelmoschus manihot* apresentou efeito anabólico e espermátogênico em camundongos, principalmente nas doses de 100 e 200 mg/kg, houve também um aumento na contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo, prolongação da ereção do pênis e melhora do comportamento sexual (Rewatkar et al., 2010).

Embora algumas plantas possuam efeitos positivos sobre o epidídimo, outras podem ter efeito contrário. Um estudo com o extrato de *Hypericum humifusum* mostrou que a administração de 200 e 400 mg/kg diminui a produção espermática do epidídimo e a viabilidade espermática nos animais tratados (Hammami et al., 2017).

Apesar de já existirem estudos a respeito do perfil fitoquímico de *Athenaea velutina* (Almeida, 2019; Prazeres, 2020), nenhum estudo relativo a seu efeito sobre as funções reprodutivas foi descrito. No entanto, com base nos estudos utilizando a espécie *W. somnifera*, que pertence à mesma subtribo (*Withaninae*), é possível que *A. velutina* possua o mesmo efeito afrodisíaco e não cause toxicidade nos testículos e epidídimos.

A espécie *W. somnifera* (L.) Dunal é bastante conhecida na Ásia e na África por suas propriedades afrodisíacas. O estudo de Ahmad et al. (2010) descreve que o extrato de *W. somnifera* aumenta a concentração e motilidade espermáticas em homens inférteis. O estudo ainda mostra que houve um aumento das concentrações séricas de testosterona e LH, além disso, foi observado uma melhora significativa na qualidade espermática. Outro estudo avaliou os mesmos parâmetros que Ahmad et al. (2010) em homens inférteis tratados com extrato de *W. somnifera* e foi observado aumento de 167 % na concentração de espermatozoides. Ainda, o estudo mostrou que o extrato da planta melhorou a motilidade espermática em 57 % e o volume de sêmen em 53 %, além de aumentar os níveis de testosterona e LH (Ambiye et al., 2013).

Os estudos de Bhargavan et al (2015) e Kumar et al. (2015b) descreveram a reversão dos danos testiculares em ratos induzidos com álcool e arsênio, respectivamente. O trabalho de Kumar et al. (2015b) mostra que a contagem e a motilidade de espermatozoides no grupo submetido ao arsênio e tratado com *W. somnifera* aumentou consideravelmente, além disso, as concentrações de testosterona e LH aumentaram. Em relação ao estudo de Bhargavan et al. (2015) foi observado uma redução nas anormalidades nos espermatozoides induzidas pelo álcool 50 %, além de melhora da motilidade espermática, quando os animais foram tratados com *W. somnifera*.

### 3.5 – Estresse oxidativo na reprodução

Muitas plantas podem ter compostos que afetam o equilíbrio redox das células, interferindo nos parâmetros reprodutivos. Por isso, para que a ação fitoterápica das mesmas seja avaliada é necessário estimar a atividade de algumas enzimas e mensurar a concentração de marcadores relacionados ao estresse oxidativo nos modelos animais utilizados (Siewert et al., 2019).

O estresse oxidativo ocorre pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs), que são neutralizadas pelas defesas antioxidantes do organismo (Schieber & Chandel, 2014). As EROs, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ), atacam macromoléculas celulares incluindo DNA, proteínas e lipídios, podendo gerar uma série de danos celulares e fisiopatológicos, por isso é necessário o processo de desintoxicação para que os danos às macromoléculas não ocorram de modo excessivo (Ribeiro et al., 2005).

Nos órgãos reprodutivos, a produção de EROs pode ser proveniente das mitocôndrias e de uma variedade de enzimas, tais como as xantinas, citocromo P450 e NADPH oxidase (Aitken & Roman, 2008). O sistema antioxidante enzimático é responsável por manter o equilíbrio das concentrações das EROs dentro dos limites fisiológicos. Desse sistema fazem parte as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e enzimas do ciclo redutor da glutathione, tais como a glutathione S-transferase (GST) e a glutathione peroxidase (GPx) (Andrade Junior et al., 2005; Ribeiro et al., 2005).

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas, juntamente com a CAT, que em meio aquoso, catalisa a reação de dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  em células aeróbicas. Além disso, o  $O_2^-$  atua na produção do radical hidroxila ( $OH^-$ ), porém, também atua na defesa do organismo contra infecções. O  $OH^-$  reage amplamente com aminoácidos, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) (Rahman et al., 2006). Ao passo seguinte, a CAT atua na decomposição do  $H_2O_2$ , formado pela ação da SOD, em  $H_2O$  e  $O_2$  (Andrade Junior et al., 2005). O  $H_2O_2$  é extremamente deletério, pois participa de reações que produzem o  $OH^-$ , esse composto possui meia-vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com metais de transição e algumas hemoproteínas. O  $H_2O_2$  pode ainda induzir alterações cromossômicas, romper a coluna do DNA e, na ausência de catalisadores, oxidar compostos sulfidríla (Ferreira & Matsubara, 1997; Comhair & Erzurum, 2002).

A GST está envolvida na desintoxicação da célula contra substâncias exógenas, por meio de conjugados de glutathione com xenobióticos e produtos aldeídicos que são produzidos

na peroxidação lipídica (Hermes-lima, 2004). Além disso, também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Andrade Junior et al., 2005; Valko et al., 2007). A GPx é a principal peroxidase em vertebrados, quando a CAT está saturada ou sua atividade está prejudicada, a GPx é a principal enzima responsável pela conversão de  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  nos órgãos reprodutivos (Kaur et al., 2006). É uma enzima que contém selênio em seu sítio ativo e é responsável pela redução dos peróxidos, utilizando glutathiona reduzida (GSH) como substrato doador de elétron, transformando-a em glutathiona oxidada (Damasceno et al., 2002; Kinnula, 2005).

Além da atividade das enzimas antioxidantes, existem outros marcadores de estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos como, por exemplo, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonilada (PC). Os ensaios de TBARS mensuram a concentração de malondialdeído (MDA), esta molécula é um sinalizador de estresse oxidativo, que é formado a partir de peroxidação lipídica no tecido (Janero, 1990). A proteína carbonilada (PC) é utilizada como marcador pelo fato de ocorrerem fragmentação das cadeias proteicas e oxidação de aminoácidos durante o estresse oxidativo, no caso, essas reações produzem compostos carbonilados como produto final (Vasconcelos et al., 2007).

Os primeiros estudos farmacológicos e toxicológicos com *A. velutina* ainda estão sendo elucidados. Além disso, poucos estudos são descritos com extrato de *W. somnifera*, avaliando as enzimas e os marcadores de estresse oxidativo no tecido testicular ou epididimário (Segupta et al., 2019). Bhargavan et al. (2015) descreveram que o extrato etanólico de *W. somnifera* regula positivamente a atividade da SOD e negativamente as concentrações de MDA nos animais submetidos à solução alcoólica. O estudo de Kumar et al. (2015) mostra que as concentrações de MDA nos animais expostos ao arsênio e tratados com *W. somnifera* diminuíram, o que resultou na recuperação da espermatogênese.

Apesar dos benefícios que as plantas trazem à reprodução masculina, ainda é necessário avaliar seus efeitos toxicológicos sobre os órgãos reprodutivos, principalmente de plantas proveniente da biodiversidade brasileira. Embora existam ainda poucos estudos com *Athenaea velutina*, a planta tem-se mostrado promissora, podendo possuir efeitos significativos na reprodução masculina, já que pertence à mesma filogenia de plantas que têm efeitos benéficos na reprodução. Dessa forma, *A. velutina* poderá ser utilizada futuramente para fins terapêuticos na reprodução.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – Dados randômicos e coleta das folhas de *A. velutina*

A princípio, a coleta do material vegetal foi realizada por Almeida et al. (2020) juntamente com o grupo de Bioprospecção Molecular no uso Sustentável da Biodiversidade (BIOPROS), coordenado pelo Prof. Dr. João Paulo Viana Leite do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Este trabalho foi realizado em parceria com o grupo BIOPROS, onde parte do estudo visou o efeito do extrato de *Athenaea velutina* sobre parâmetros reprodutivos.

As folhas de *A. velutina* foram coletadas em dois lugares distintos: o primeiro foi na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA) na Mata do Paraíso (Viçosa, Minas Gerais, Brasil), pertencente à Universidade Federal de Viçosa – UFV; o outro foi no Parque Estadual do Itacolomi (Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil). As exsiccatas foram depositadas no Herbário VIC da UFV e no Herbário “Professor José Badini”, da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP, sob os registros VIC 047742 e OUPR 32617, respectivamente. O cadastro do acesso ao patrimônio genético foi obtido junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN (nº AD6E1F9), como também autorização do acesso ao patrimônio genético na Unidade de Conservação do Parque do Itacolomi foi obtido pelo Instituto Estadual de Florestas - IEF (nº 011/2019).

### 4.2 – Preparo do extrato etanólico da *A. velutina*

Após a coleta, as folhas foram lavadas, selecionadas e secadas em estufa (PEG100, Pardal®) em ventilação circular a 40 °C, por um período de 48h. Posteriormente, o material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas (MA680, Marconi®). O material pulverizado foi embebido empregando como solvente extrator o álcool etílico 99,5% por 2 horas. Posteriormente, foi submetido à extração por percolação exaustiva, onde o solvente foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo sob pressão reduzida (R-200 e R-3, Büchi®), obtendo-se, ao final, o extrato etanólico seco. Os procedimentos foram realizados no laboratório do BIOPROS, conforme metodologia de rotina (Prazeres, 2020). Em seguida, o extrato foi liofilizado para a completa remoção do solvente no laboratório de nutrição animal do Departamento de Zootecnia da UFV.

### 4.3 – Delineamento experimental

Para o estudo *in vivo* foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar adultos (60 dias), 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/escuro) e temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Os animais foram mantidos em caixas separadas para verificação do consumo de ração e água. O ganho de massa corporal (g) dos animais foi verificado semanalmente, assim como as condições de saúde e possíveis evidências clínicas de toxicidade durante o tratamento, tais como alterações na pelagem, nos olhos e nas mucosas, respiração incomum, presença de secreções, lacrimação, presença de movimentos involuntários, limpeza corporal excessiva andar em círculos repetitivos, caminhar para trás e automutilação (Malone & Robichaud, 1962). Os procedimentos experimentais seguiram os protocolos determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa - UFV sob o protocolo nº 82/2018.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos experimentais ( $n = 5/\text{grupo}$ ), e depois tratados durante 28 dias por gavagem, seguindo o protocolo da ANVISA (2013) para estudos clínicos de dose repetida, sendo dois grupos mantidos por mais 14 dias para avaliar a reversibilidade, a persistência ou o atraso na ocorrência dos possíveis efeitos toxicológicos (Oecd, 2008). As doses foram definidas de acordo com as diretrizes da ANVISA (2013), onde a dose máxima sugerida é de 1000 mg/kg/dia, estabelecendo uma sequência de dose decrescente na frequência de 2 a 4 vezes para definição das doses. O extrato foi ressuspenso em *phosphate buffered saline* (PBS) (600 $\mu\text{L}$ ) e 1% dimetilsulfóxido (DMSO), com auxílio de ultrassom a 60° C.

Os grupos foram denominados da seguinte forma: **controle**, animais tratados com o veículo (PBS) (600 $\mu\text{L}$ ) e 1% de DMSO; **G250**, animais tratados com 250 mg/kg do extrato etanólico; **G500**, animais tratados com 500mg/kg do extrato etanólico; **G1000**: animais tratados com 1000 mg/kg do extrato etanólico. Outros dois grupos de animais, que foram mantidos por mais 14 dias após o tratamento, foram denominados de *recovery*: **controle recovery**, inicialmente tratado com PBS (600 $\mu\text{L}$ ) e DMSO (1%); **G1000R**, inicialmente tratado com 1000 mg/kg do extrato etanólico.

#### 4.4 – Coleta do material biológico e biometria testicular

Após o período de tratamento, os animais foram sedados e anestesiados com xilazina 10 mg/kg/ip e cloridrato de quetamina 150 mg/kg/ip. Primeiramente, as amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, sendo centrifugadas por 15 minutos a 4.119 x g. O soro foi recuperado e congelado a -20 °C. Já os órgãos, testículos, epidídimos e glândulas acessórias, foram removidos, dissecados e pesados (g) em balança analítica. O testículo e epidídimo esquerdo, após serem separados, foram fixados por 24h em solução fixadora de Karnovsky (1965) com tampão cacodilato e destinados para avaliações histomorfométricas. O testículo e o epidídimo direito foram removidos para análises de estresse oxidativo, congelados em nitrogênio líquido e mantidos no ultrafreezer a -80 ° C até a realização da análise.

Logo após a fixação, o testículo esquerdo foi cortado e a albugínea retirada e pesada, subtraindo-a da massa (g) do testículo inteiro (Souza et al., 2016a). Com a massa corporal e testicular foi possível calcular o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual da massa corporal alocado em gônadas, a partir da fórmula:

$$IGS (\%) = (MG / PC) \times 100; \text{ massa corporal (MG); massa total das gônadas (MG).}$$

A partir da massa do parênquima testicular (massa testicular – massa da albugínea) e da massa corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) por meio da equação:

$$IPS (\%) = (MP / MC) \times 100, \text{ sendo MP a massa do parênquima dos dois testículos.}$$

#### 4.5 – Processamento histológico dos órgãos reprodutores

Um fragmento testicular e da região da cabeça e cauda do epidídimo fixado foi desidratado em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%) e incluído em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Cortes histológicos semi-seriados de 3 µm foram obtidos usando micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) e corados com azul de toluidina-borato de sódio 1%. Primeiramente, os cortes histológicos foram avaliados qualitativamente em microscopia de luz, sendo avaliados os aspectos gerais da arquitetura tecidual característica para cada órgão.

#### 4.6 – Análises histopatológicas testicular e epididimária

Logo após o processo de montagem das lâminas histológicas, foram realizadas as análises histopatológicas, sendo observados 200 túbulos aleatoriamente nas preparações histológicas de cada animal (Picut et al., 2017). Segundo Johnsen (1970), as patologias são

classificadas da seguinte forma: **Nível 1** - túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; **Nível 2** - espaços vacuolares na base do epitélio; **Nível 3** - espaços vacuolares no ápice do epitélio; **Nível 4** - espaços vacuolares na base e no ápice do epitélio; **Nível 5** - células espermatogênicas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração visível; **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. Por sua vez, Dias et al. (2019) agruparam estes níveis em normal (nível 1), leve (níveis 2 e 3), moderado (níveis 4 e 5) e severo (níveis 6, 7 e 8). Na histopatologia do epidídimo foram observados os aspectos gerais como degeneração tubular, vacuolização no epitélio, ausência de espermatozoides no lúmen, presença de células germinativas no lúmen e infiltrado inflamatório (Kempinas & Klinefelter, 2014).

#### 4.7 – Morfometria testicular

As análises morfométricas testiculares foram realizadas usando imagens digitais obtidas em fotomicroscópio Leica DM500 (Microsystems-Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Leica ICC50W, Alemanha). As imagens foram analisadas utilizando o *software Image J*® (National Institute of Health, USA). As proporções volumétricas dos componentes testiculares (%) foram computadas a partir da contagem de 266 pontos em 10 campos aleatórios, totalizando 2.660 pontos em cada preparação histológica por animal. Os pontos foram registrados ao coincidirem sobre a túnica própria, epitélio, lúmen e intertúbulo (Dias et al., 2019; Souza et al., 2016a). Para determinar a proporção volumétrica dos componentes testiculares foi utilizada a 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.*

As proporções dos componentes testiculares (mL) foram calculadas levando em consideração o percentual de ocupação de cada elemento multiplicado pelo volume do parênquima testicular. A avaliação dos índices tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) foram avaliados pelas seguintes fórmulas:

*ITS = VTS / PC x 100 e IES = VES / PC x 100, respectivamente, onde VTS = volume de túbulo seminífero, VES = volume de epitélio seminífero e PC = peso corporal.*

Para obtenção do diâmetro tubular médio foram medidos, de forma aleatória, 30 túbulos seminíferos que apresentaram forma orbicular. Para a avaliação da altura do epitélio

seminífero, a mensuração foi 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 (França & Russell, 1998). O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT/T), medida em metros, foi estimado a partir do conhecimento da capacidade ocupada pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio (DTM) obtido para cada animal (Dorst e Sajonski, 1974). O comprimento total de túbulo por grama de testículo (CTT/Tg) foi calculado a partir da fórmula:  $CTT/Tg = \text{Comprimento total de túbulos} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$ .

Para avaliação das áreas tubular (ART), epitelial (ARE) e luminal (ARL) foram utilizadas as equações:  $ART = RT^2$ , onde  $RT = \text{raio tubular}$ ;  $ARL = RL^2$ , onde  $RL = \text{raio luminal}$ ;  $ARE = ART - ARL$  e a Relação T/E =  $ART / ARE$  (Dias et al., 2019).

Para as análises dos elementos do intertúbulo foi definida a contagem de 1000 pontos por animal, a partir de imagens obtidas em aumento de 400X, sendo contabilizados os pontos incidentes sob os componentes do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, núcleo das células de Leydig e citoplasma das células de Leydig (Souza et al., 2016a). O cálculo utilizado foi da seguinte forma:

*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 total.*

A partir do diâmetro nuclear da célula de Leydig, 30 núcleos esféricos, com nucléolo e cromatina perinuclear bem definidos, foram analisados para então calcular os volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e de cada célula de Leydig (VL) por meio da fórmula:  $VNL = 4/3 \pi R^3$ , onde  $R = \text{Raio nuclear}$ ;  $VCL = \% \text{ de citoplasma} \times VNL / \% \text{ de núcleo}$ ,  $VL = VNL + VCL$ .

O cálculo realizado em razão do volume ocupado pelas células de Leydig no testículo (VLT) foi analisado pela equação:  $NL = VLT / VL$ , onde:  $VLT = \text{Volume de Leydig por testículo}$  e  $VL = \text{Volume de uma célula de Leydig}$ .  $NLg/T = NL / PT$ , onde  $PT = \text{Peso testicular total}$ .

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

#### 4.8 – Morfometria epididimária

As análises morfométricas epididimárias foram realizadas usando imagens digitais obtidas em fotomicroscópio Leica DM500 (Microsystems-Wetziar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Leica ICC50W, Alemanha). As imagens foram analisadas utilizando o *software Image J*® (National Institute of Health, USA). A análise morfométrica foi realizada a partir de 10 campos aleatórios das duas regiões avaliadas (cabeça e cauda) por animal, usando 20 secções tubulares que apresentaram forma orbicular. A partir dessas secções foram analisados o diâmetro tubular, diâmetro luminal e a altura do epitélio, que foi obtida da lâmina basal até o lúmen tubular, sendo feita uma média de quatro medidas da altura do epitélio e área diametral do ducto (Souza et al. 2016b).

#### 4.9 – Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

As análises enzimáticas foram realizadas no laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, coordenado pelo Prof. Dr. Leandro Licursi de Oliveira do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O procedimento ocorreu com a homogeneização do testículo e epidídimo em 1000µL de solução tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e centrifugados a 12000 rpm, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem das enzimas antioxidantes testiculares como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona-S-transferase (GST); e dos marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada (PC). Os dados bioquímicos foram normalizados por meio da concentração de proteínas total no sobrenadante. A atividade enzimática foi determinada em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) (Lima et al., 2018).

A determinação da atividade da SOD no sobrenadante foi realizada conforme o método descrito por Del Maestro e Mcdonald (1985), onde foram pipetadas 10 µL das amostras nos poços e em quatro poços da microplaca foram pipetados 10 µL de tampão fosfato de pH 7,8 para a controle. Realizou-se leitura de absorbância pela primeira vez em comprimento de onda de 320 nm. Logo após, foram adicionados em todas as amostras 20 µL da solução de pirogalol e encubado por 30 min a 37°C no escuro, posteriormente, foi lido a 320 nm. A atividade de CAT foi avaliada a partir da taxa de decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medida no tempo 0,3 e 60 segundos, como definido por Aebi (1984). Para a obtenção da curva padrão foram selecionados oito pontos, onde no primeiro ponto foi pipetado 100 µL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no segundo ponto foi pipetado 100 µL de tampão fosfato mais 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em

seguida, nos outros pontos foram feitas diluições seriadas, retirando 100  $\mu\text{L}$  do ponto anterior, ao fim, foi pipetado 150  $\mu\text{L}$  de molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) em todos os poços da curva. Para as amostras, foi pipetado 5  $\mu\text{L}$  de cada em dois poços, em um dos poços foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de solução de tampão fosfato (branco), depois adicionado 150  $\mu\text{L}$  de molibdato de amônio. No outro poço foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e cronometrado conforme o tempo descrito anteriormente, e após foi lido em 374 nm.

A atividade da GPx foi determinada com base em Cichoski et al. (2012). Para a análise, foram utilizados 15  $\mu\text{L}$  de homogenato de cada órgão e pipetados nos poços da microplaca. Para o controle, foram utilizados 15  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato a 60 mM com azida sódica (1,0 mM) e EDTA (0,5 mM), pH 7,0 (tampão reacional). O objetivo da adição de azida sódica foi inibir a atividade da catalase (Keilin & Hartree, 1934). O meio de reação era composto por 243  $\mu\text{L}$  de tampão reacional, contendo glutathiona reduzida (1,12 mM), NADPH (0,2 mM) e glutathiona-redutase (0,243 U). Para que a reação ocorresse, foram adicionados ao meio 42  $\mu\text{L}$  do substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,72 mM. Houve incubação por 15 min a 37 °C e o decaimento da absorbância do NADPH a 340 nm foi mensurado por 5 min. Uma unidade de atividade de GPx foi definida indiretamente como sendo a quantidade necessária da enzima para oxidar 1 nM de NADPH a  $\text{NADP}^+$  por minuto. A glutathiona S-transferase (GST) foi realizada pela formação de conjugado glutathiona-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em cubeta com 5  $\mu\text{L}$  da amostra, o tempo total do ensaio foi de 60s, sendo desprezados os 30s iniciais. As amostras foram lidas no espectrofotômetro a 340 nm (Habig et al., 1974).

Os resultados da peroxidação lipídica, que são as concentrações de malondialdeído (MDA), foram avaliados utilizando a solução TBARS (ácido tricloroacético 15%/ácido tiobarbitúrico 0,375% /ácido clorídrico 0,25M). As concentrações totais de MDA foram feitas utilizando 200  $\mu\text{L}$  das amostras que reagiram com 400  $\mu\text{L}$  solução TBARS (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico, 0,25N HCL) por 40 minutos em banho-maria a 90° C. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm (Wallin, 1993). As concentrações de proteínas carboniladas foram medidas pela adição de 500  $\mu\text{L}$  da solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) aos grânulos do tecido. O dano proteico foi determinado no sobrenadante final, com base nos grupos carbonila da reação DNPH, e medido em espectrofotometria a 370 nm (Levine et al., 1990). 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.

#### 4.10 – Análise estatística

Os resultados dos animais tratados por 28 dias (controle, G250, G500 e G1000) foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Logo após, as variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, e para as variáveis não paramétricas foi realizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn's, para comparação entre os grupos. Para os tratamentos *recovery* (controle *recovery* e G1000R) foi utilizado o teste T, para comparar a média entre dois grupos. Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), sendo o nível de significância considerado de  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas pelo *software GraphPad Prism* (versão 7.0).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 – Condições clínicas e consumo de água e ração

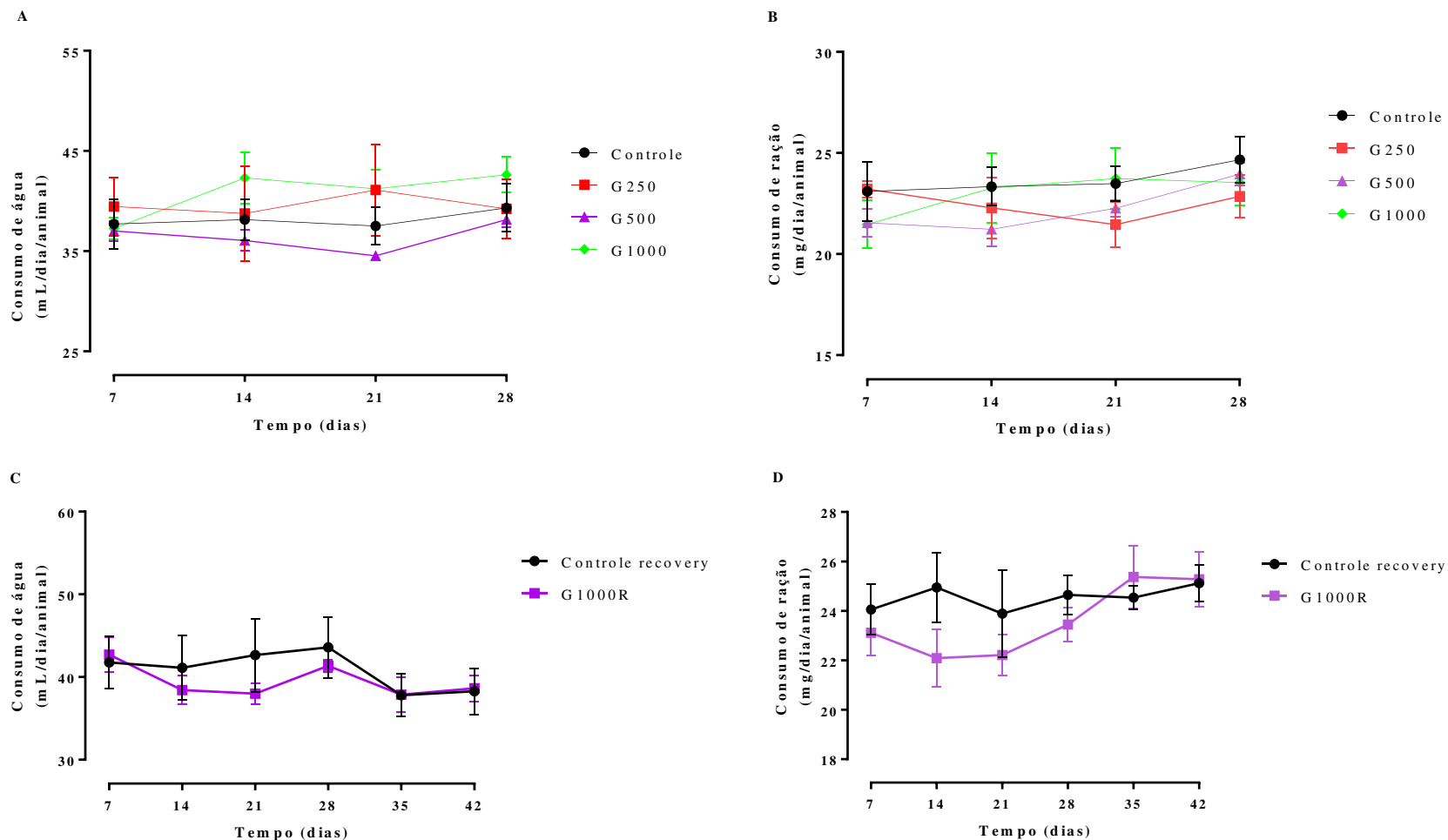
Durante todo o período de tratamento, as condições clínicas e o consumo de água e ração foram avaliados diariamente. Os sinais clínicos nos animais, que podem indicar toxicidade, não foram observados durante o período de tratamento.

Os valores do consumo diário de água (mL) e ração (mg) foram agrupados semanalmente para a realização da estatística. Os animais tratados por 28 dias (G250, G500 e G1000) não apresentaram diferença estatística, em relação ao controle, no consumo de água (Fig. 3A) e ração (Fig. 3B) ( $p > 0,05$ ). Os animais tratados durante 28 dias e observados durante 14 dias (*recovery*) também não apresentaram diferença significativa no consumo de água (Fig. 3C) e ração (Fig. 3D) semanal ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2 – Massa corporal e dos órgãos reprodutivos

A estatística da massa corporal dos animais tratados por 28 dias (controle, G250, G500 e G1000) foi feita da massa final ao término do tratamento, assim como dos animais *recovery* (controle *recovery* e G1000R) que foi feita após o término dos 14 dias de observação. Em todos os grupos tratados não houve diferença significativa da massa corporal em relação aos respectivos controles (Tab.1;  $p > 0,05$ ).

Os parâmetros biométricos (g) dos órgãos reprodutivo e os índices gonadossomático e parenquimossomático (%), não apresentaram diferença significativa entre os animais tratados e os controles (Tab. 1;  $p > 0,05$ ).



**Figura 3.** Efeito da administração por via oral do extrato de *A. velutina* em ratos Wistar sobre o consumo de água (mL/dia/animal) e ração (mg/dia/animal) durante período de 28 dias (n=5/grupo) (A e B) e 28 dias + 14 dias de recuperação (n=5/grupo) (C e D), avaliados semanalmente. Controle: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G250: 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500: 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; Controle *recovery*: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G1000R: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*. Média  $\pm$  SEM. Os valores foram comparados pelo teste de Tukey (controle, G250, G500 e G1000) e teste T (controle *recovery* e G1000) ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Parâmetro biométrico corporal e dos órgãos reprodutores masculinos dos ratos Wistar tratados com *A. velutina*.

Parâmetro	Controle	G250	G500	G1000	Controle <i>recovery</i>	G1000R
Massa corporal (g)*	332,80 ± 29,59	337,20 ± 12,03	330,80 ± 10,89	335,2 ± 12,76	350,8 ± 15,57	359,0 ± 12,87
Testículo (g)*	1,79 ± 0,01	1,74 ± 0,07	1,88 ± 0,08	1,77 ± 0,04	1,74 ± 0,07	1,81 ± 0,01
Túnica albugínea (g)*	0,36 ± 0,10	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,07	0,28 ± 0,01	0,34 ± 0,07	0,32 ± 0,05
Parênquima testicular (g)	3,22 ± 0,12	3,22 ± 0,15	3,49 ± 0,15	3,26 ± 0,10	3,14 ± 0,15	3,29 ± 0,06
Epidídimo (g)	0,84 ± 0,08	0,71 ± 0,03	0,75 ± 0,03	0,70 ± 0,01	0,73 ± 0,02	0,73 ± 0,01
Vesícula seminal (g)	1,52 ± 0,08	1,31 ± 0,08	1,77 ± 0,08	1,53 ± 0,07	1,61 ± 0,07	1,70 ± 0,10
Próstata (g)	1,09 ± 0,10	1,18 ± 0,19	0,90 ± 0,02	0,98 ± 0,06	0,98 ± 0,12	0,96 ± 0,07
Índice gonadossomático (%)	1,12 ± 0,11	1,04 ± 0,04	1,13 ± 0,03	1,06 ± 0,04	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,03
Índice parenquimossomático (%)	0,90 ± 0,005	0,95 ± 0,041	1,05 ± 0,031	0,97 ± 0,047	0,90 ± 0,05	0,92 ± 0,03

Dados expressos como média ± SEM ( $p > 0,05$ ). Teste de Tukey e Dunn's\*: controle, 600 µL de PBS e 1% de DMSO; G250, 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500, 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias). Teste T: controle *recovery*, 600 µL de PBS e 1% de DMSO; G1000R, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação).

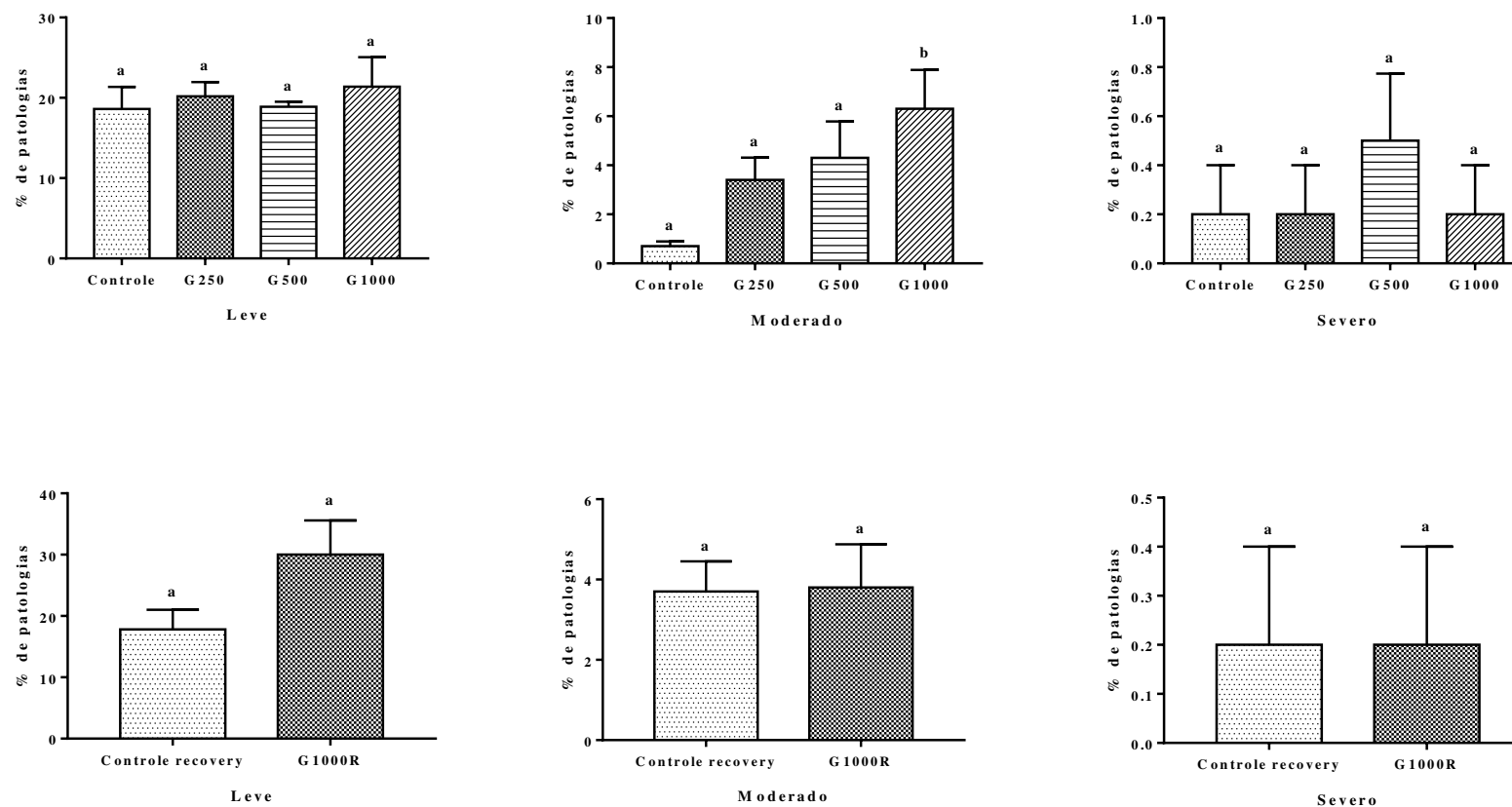
### 5.1. – Histopatologia testicular e epididimária

Os animais do grupo controle apresentaram túbulos seminíferos normais, compostos por túnica própria, epitélio seminífero bem definido, com as células da linhagem germinativas dispostas uniformemente (Fig. 5). A porcentagem de patologias leves, moderadas e severas, associadas ao túbulo seminífero, não evidenciou alterações significativas nos animais dos grupos G250 e G500, em relação ao controle (Fig. 4;  $p > 0,05$ ). No entanto, foi observado um aumento nas patologias moderadas, principalmente vacúolos na base e no ápice do epitélio seminífero dos animais G1000 (Fig. 4;  $p = 0,03$ ).

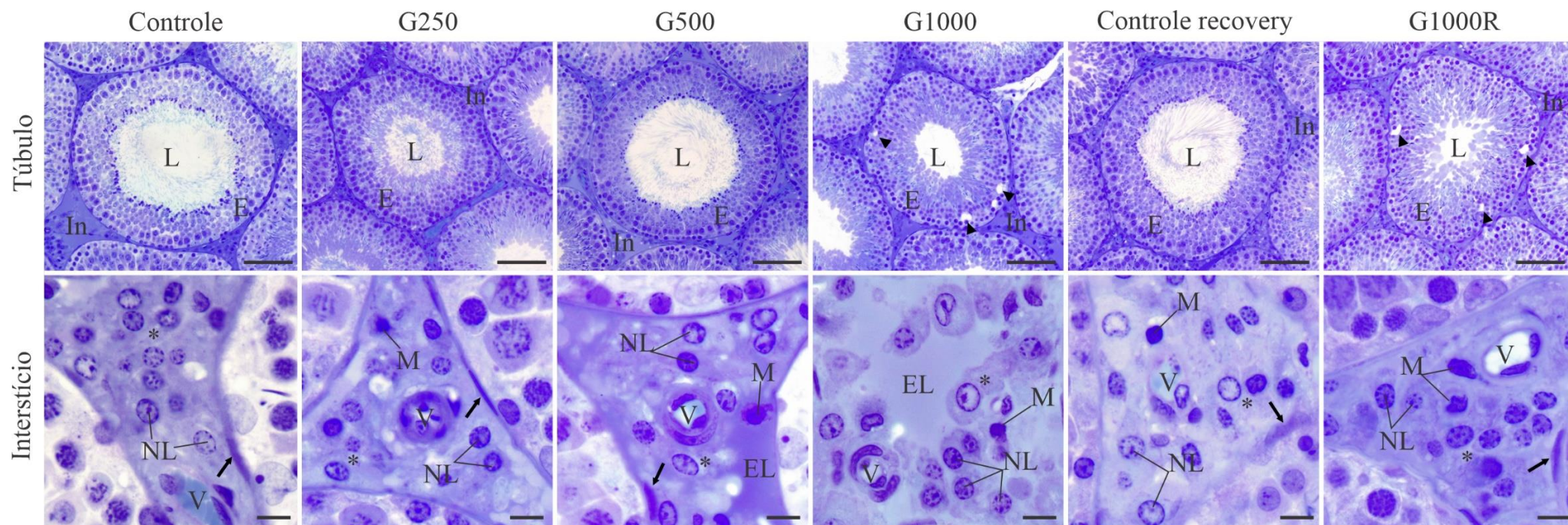
Em relação aos animais do grupo controle *recovery*, a microestrutura tecidual apresentou-se normal, com túbulos seminíferos sem alterações e as células do epitélio germinativo disposta uniformemente (Fig. 5). As patologias leves, moderadas e severas não foram significativas nos animais do grupo G1000R, sendo observadas apenas alguns vacúolos na base do epitélio (Fig. 5).

A arquitetura tecidual do interstício dos animais controle, G250, G500 e G1000, assim como os animais do controle *recovery* e G1000R, apresentaram-se normais, sendo observados a túnica própria, que separa a região basal da intersticial, o núcleo das células de Leydig com nucléolo evidente, região citoplasmática sem alteração, a presença de células fagocitárias, vasos sanguíneos e o espaço linfático (Fig. 5).

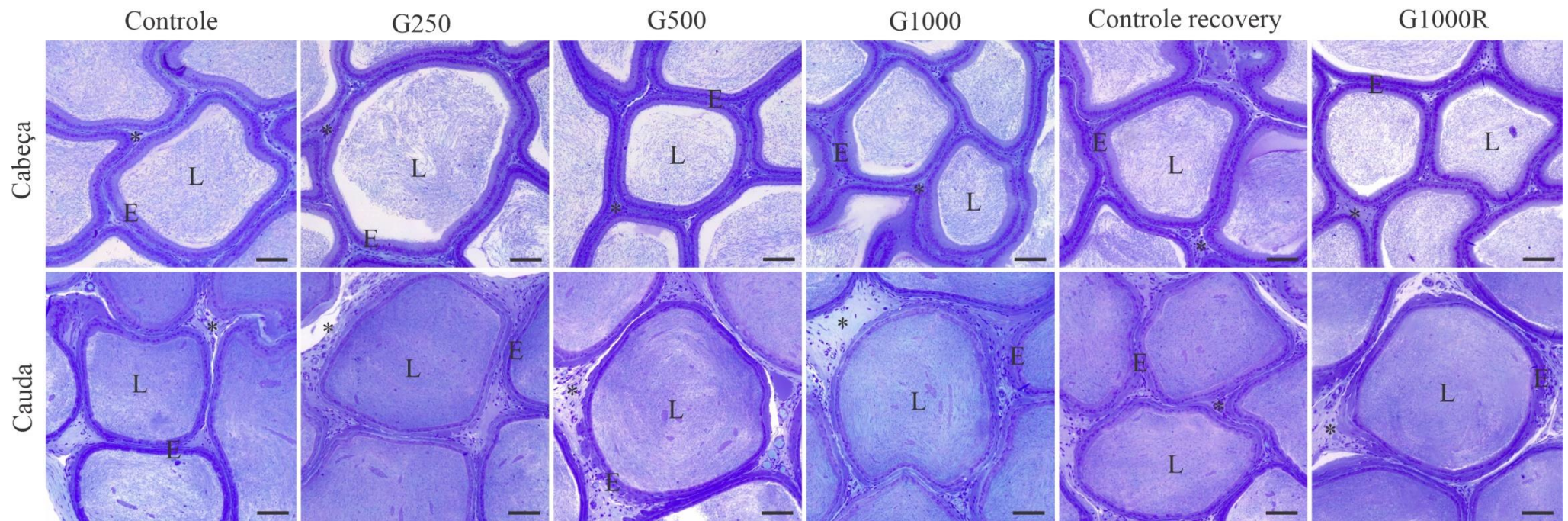
Na arquitetura tecidual epididimária dos animais tratados por 28 dias (controle, G250, G500 e G1000), assim como dos animais *recovery* observados por 14 dias após tratamento (controle *recovery* e G1000R), foi observada a preservação das estruturas, tanto tubular quanto intersticial. O compartimento tubular apresentou-se normal. Na região luminal do epidídimo dos mesmos animais não foram observadas alterações, sendo observado o conteúdo luminal intacto (Fig. 6). Igualmente, a microestrutura tecidual da região intersticial epididimária dos animais tratados foram similares, sendo observada a preservação dos componentes do tecido conjuntivo (Fig. 6).



**Figura 4.** Proporção de túbulos seminíferos patológicos de ratos Wistar tratados por 28 dias via oral com extrato de *A. velutina*. Leve (níveis 2 e 3), moderado (níveis 4 e 5) e severo (níveis 6, 7 e 8), de acordo com Dias et al. (2019). Controle: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G250: 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500: 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; Controle *recovery*: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G1000R: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*. Média  $\pm$  SEM. <sup>a, b</sup> Diferentes letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (controle, G250, G500 e G1000) e teste T (controle *recovery* e G1000) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Secções histológicas dos testículos de ratos Wistar adultos. Regiões tubular e intersticial. Controle: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G250: 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500: 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias) (n=5/grupo); Controle *recovery*: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G1000R: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação) (n=5/grupo). E = epitélio, L = lúmen, In = interstício; cabeça de seta = vacúolos; NL = núcleo de Leydig; V = vaso sanguíneo; EL = espaço linfático; M = macrófagos; \* = citoplasma de células de Leydig; seta = túnica própria. Coloração de azul de toluidina. Barras de escala: túbulo = 100  $\mu$ m; interstício = 10  $\mu$ m.



**Figura 6.** Secções histológicas do epidídimo de ratos Wistar adultos. Regiões da cabeça e cauda. Controle: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G250: 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500: 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias) (n=5/grupo); Controle *recovery*: 600  $\mu$ L de PBS e 1% de DMSO; G1000R: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação) (n=5/grupo). E = epitélio, L = lúmen; \* = tecido conjuntivo no interstício. Coloração de azul de toluidina. Barras de escala = 100  $\mu$ m.

### 5.3 – Morfometria testicular

Os percentuais e volumes de testículo, epitélio e túbulo assim como o índice tubulossomático dos animais tratados por 28 dias (G250, G500 e G1000) não apresentaram diferença significativa em comparação ao controle (Tab. 2;  $p > 0,05$ ). Entretanto, o percentual e o volume da túnica própria apresentaram aumento significativo nos animais dos grupos G500 ( $p = 0,002$ ;  $p = 0,004$ ; respectivamente) e G1000 ( $p = 0,006$ ;  $p = 0,03$ ; respectivamente). Além disso, foi observada diminuição no percentual do lúmen nesses mesmos grupos, G500 ( $p = 0,02$ ) e G1000 ( $p = 0,03$ ). O índice epitéliossomático apresentou aumento significativo nos animais G500 ( $p = 0,01$ ). Já os percentuais, volumes e índices tubulossomático e epitéliossomático dos animais *recovery* não houve diferença significativa entre os grupos (Tab. 2;  $p > 0,05$ ).

Em relação aos dados morfométricos do túbulo seminífero, dos animais tratados por 28 dias, não foi observada diferença no diâmetro tubular ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, a altura do epitélio dos animais do grupo G500 ( $P = 0,005$ ) e G1000 ( $p = 0,02$ ) teve aumento significativo, embora apenas nos animais G500 foi observada diminuição do diâmetro luminal ( $p = 0,01$ ) (Tab. 3).

O comprimento total de túbulos (CTT/T), de túbulos por grama de testículo (CTT/Tg), área do túbulo e área do epitélio não tiveram diferença significativa em relação ao controle ( $p > 0,05$ ; Tab. 3). Entretanto, observou-se diminuição da área do lúmen dos animais do grupo G500 ( $p = 0,01$ ), assim como a relação entre túbulo/epitélio, que teve diminuição nos grupos G500 ( $p < 0,0001$ ) e G1000 ( $p = 0,0005$ ) (Tab. 3). Em relação aos tratamentos *recovery* não foi observada diferença significativa entre os grupos (Tab. 3;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Percentual e volume de túbulo seminífero e seus componentes em ratos Wistar tratados com extrato etanólico de *A. velutina*.

Parâmetro	Controle	G250	G500	G1000	Controle <i>recovery</i>	G1000R
Túbulo (%)	92,47 ± 0,91	94,20 ± 0,69	92,98 ± 0,31	92,71 ± 0,80	92,18 ± 0,80	93,56 ± 0,85
Epitélio (%)	69,93 ± 1,10	70,82 ± 0,89	70,76 ± 0,84	70,58 ± 0,67	67,23 ± 1,09	68,48 ± 1,01
Túnica própria (%)	4,13 ± 0,74 <sup>a</sup>	5,81 ± 0,14 <sup>a</sup>	7,22 ± 0,27 <sup>b</sup>	6,94 ± 0,61 <sup>b</sup>	8,13 ± 0,28	7,94 ± 0,24
Lúmen (%)	18,41 ± 1,15 <sup>a</sup>	17,57 ± 0,63 <sup>a</sup>	14,99 ± 0,38 <sup>b</sup>	15,19 ± 0,58 <sup>b</sup>	16,82 ± 0,54	17,14 ± 0,75
Volume de túbulo (mL)	3,00 ± 0,11	3,03 ± 0,14	3,24 ± 0,14	3,02 ± 0,10	2,89 ± 0,13	3,08 ± 0,05
Volume de epitélio (mL)	2,25 ± 0,06	2,28 ± 0,11	2,46 ± 0,10	2,30 ± 0,07	2,11 ± 0,11	2,25 ± 0,05
Volume de túnica própria (mL)	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Volume luminal (mL)	0,59 ± 0,05	0,56 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,56 ± 0,01
Índice tubulossomático (%)	0,84 ± 0,006	0,90 ± 0,03	0,98 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,83 ± 0,04	0,86 ± 0,02
Índice epiteliossomático (%)	0,62 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,04	0,63 ± 0,02

Dados expressos como média ± SEM ( $p < 0,05$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos tratado e controle. Teste de Tukey: controle, 600 µL de PBS e 1% de DMSO; G250, 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500, 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias) (n=5/grupo). Teste T: controle *recovery*, 600 µL de PBS e 1% de DMSO; G1000R, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação) (n=5/grupo).

**Tabela 3.** Morfometria de túbulo seminífero de ratos Wistar tratados com extrato etanólico de *A. velutina*.

Parâmetro	Controle	G250	G500	G1000	Controle recovery	G1000R
Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ )	357,90 $\pm$ 6,95	359,6 $\pm$ 8,62	333,8 $\pm$ 10,87	344,8 $\pm$ 5,87	350,3 $\pm$ 9,28	350,7 $\pm$ 8,61
Altura de epitélio ( $\mu\text{m}$ )	79,61 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	78,50 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	91,22 $\pm$ 2,93 <sup>b</sup>	89,00 $\pm$ 1,89 <sup>b</sup>	81,08 $\pm$ 2,28	78,46 $\pm$ 1,20
Diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ )	278,2 $\pm$ 6,13 <sup>a</sup>	278,9 $\pm$ 7,17 <sup>a</sup>	242,5 $\pm$ 8,96 <sup>b</sup>	255,8 $\pm$ 5,24 <sup>a</sup>	269,2 $\pm$ 7,39	272,2 $\pm$ 7,49
CTT/T (m/g)	30,16 $\pm$ 2,10	29,98 $\pm$ 1,58	37,42 $\pm$ 2,29	32,61 $\pm$ 2,19	30,17 $\pm$ 1,74	32,14 $\pm$ 1,65
CTT/Tg (m/g)	8,40 $\pm$ 0,57	8,58 $\pm$ 0,36	10,02 $\pm$ 0,72	9,17 $\pm$ 0,41	8,71 $\pm$ 0,58	8,88 $\pm$ 0,51
Área do túbulo ( $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )	100681,0 $\pm$ 3940,0	101742,0 $\pm$ 491,0	87812,0 $\pm$ 5711,0	93452,0 $\pm$ 3133,0	96590,0 $\pm$ 5078,0	96781,0 $\pm$ 4633,0
Área do lúmen ( $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )	60894,0 $\pm$ 2671,0 <sup>a</sup>	61218,0 $\pm$ 3144,0 <sup>a</sup>	46425,0 $\pm$ 3397,0 <sup>b</sup>	51465,0 $\pm$ 2064,0 <sup>a</sup>	57064,0 $\pm$ 3102,0	58355,0 $\pm$ 3110,0
Área do epitélio ( $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )*	39787,0 $\pm$ 1477,0	40525,0 $\pm$ 1972,0	41386,0 $\pm$ 2535,0	41987,0 $\pm$ 1362,0	39526,0 $\pm$ 2080,0	38426,0 $\pm$ 1536,0
Relação T/E	2,53 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	2,51 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	2,12 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	2,22 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	2,44 $\pm$ 0,03	2,51 $\pm$ 0,02

Dados expressos como média  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos tratado e controle. CTT/T: Comprimento total de túbulo seminífero; CTT/Tg: Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo. Teste de Tukey e Dunn's\*: controle, 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G250, 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500, 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias) (n=5/grupo). Teste T: controle *recovery*, 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G1000R, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação) (n=5/grupo).

## 5.2 – Morfometria intersticial

Em relação ao percentual e volume de interstício, vasos sanguíneos, espaço linfático, conjuntivo, macrófagos, células de Leydig e seu núcleo e citoplasma, dos animais dos grupos G250, G500 e G1000, não foram observadas diferenças significativas (Tab. 4;  $p > 0,05$ ). Os mesmos percentuais e volumes também não tiveram diferença significativa nos animais do grupo *recovery* (Tab. 4;  $p > 0,05$ ).

Nos parâmetros morfométricos e estereológicos da célula de Leydig, houve aumento significativo no diâmetro nuclear da célula de Leydig nos animais do grupo G1000 ( $p = 0,02$ ), bem como no seu volume nuclear ( $p = 0,03$ ) (Tab. 5). Ainda, foi observado aumento no volume citoplasmático da célula de Leydig nos animais do grupo G500 ( $p = 0,01$ ), assim como aumento do volume de célula de Leydig nesses ( $p = 0,007$ ) (Tab. 5). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos outros parâmetros ( $p > 0,05$ ). Para os animais *recovery* não houve diferença em quaisquer parâmetros morfométricos e estereológicos da célula de Leydig (Tab. 5;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Percentual e volume do interstício testicular e seus componentes em ratos Wistar tratados com extrato etanólico de *A. velutina*.

Parâmetro	Controle	G250	G500	G1000	Controle <i>recovery</i>	G1000R
Interstício (%)	7,02 ± 0,27	5,61 ± 0,68	6,94 ± 0,29	7,19 ± 0,86	7,92 ± 1,68	6,65 ± 1,83
Vaso sanguíneo (%)	0,38 ± 0,08	0,40 ± 0,06	0,53 ± 0,07	0,48 ± 0,07	0,45 ± 0,24	0,33 ± 0,12
Espaço linfático (%)	2,20 ± 0,22	1,25 ± 0,19	2,04 ± 0,41	2,10 ± 0,88	1,54 ± 0,17	1,960 ± 0,80
Núcleo de Leydig (%)*	0,48 ± 0,04	0,42 ± 0,06	0,41 ± 0,05	0,51 ± 0,02	0,55 ± 0,13	0,49 ± 0,13
Citoplasma de Leydig (%)	3,14 ± 0,05	2,79 ± 0,36	3,12 ± 0,16	3,23 ± 0,37	3,89 ± 0,86	2,92 ± 0,84
Células de Leydig (%)	3,62 ± 0,07	3,22 ± 0,41	3,54 ± 0,21	3,74 ± 0,39	4,44 ± 0,99	3,42 ± 0,96
Conjuntivo (%)	0,65 ± 0,06	0,48 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,66 ± 0,11	0,75 ± 0,12	0,70 ± 0,21
Macrófagos (%)	0,16 ± 0,02	0,192 ± 0,02	0,198 ± 0,03	0,198 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,23 ± 0,09
Interstício (mL)	0,22 ± 0,00	0,18 ± 0,026	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,02
Vaso sanguíneo (mL)*	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Espaço linfático (mL)*	0,07 ± 0,008	0,04 ± 0,006	0,07 ± 0,008	0,06 ± 0,012	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Núcleo de Leydig (mL)*	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002
Citoplasma de Leydig (mL)	0,10 ± 0,003	0,09 ± 0,013	0,10 ± 0,007	0,10 ± 0,011	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Células de Leydig (mL)	0,11 ± 0,003	0,10 ± 0,015	0,12 ± 0,009	0,12 ± 0,012	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Conjuntivo (mL)*	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,003	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,003
Macrófagos (mL)	0,005 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,009 ± 0,00	0,007 ± 0,00

Dados expressos como média ± SEM ( $p > 0,05$ ). Teste de Tukey e Dunn's\*: controle, 600 µL de PBS e 1% de DMSO; G250, 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500, 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias) (n=5/grupo). Teste T: controle *recovery*, 600 µL de PBS e 1% de DMSO; G1000R, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação) (n=5/grupo).

**Tabela 5:** Parâmetros morfométricos e estereológicos da célula de Leydig de ratos Wistar tratados com extrato etanólico de *A. velutina*.

Parâmetro	Controle	G250	G500	G1000	Controle recovery	G1000R
Diâmetro nuclear de Leydig ( $\mu\text{m}$ )	6,54 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	6,79 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	6,99 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	7,07 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	6,39 $\pm$ 0,10	6,64 $\pm$ 0,07
Volume do núcleo de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	147,1 $\pm$ 8,80 <sup>a</sup>	164,6 $\pm$ 9,66 <sup>a</sup>	179,6 $\pm$ 9,63 <sup>a</sup>	185,7 $\pm$ 6,58 <sup>b</sup>	136,9 $\pm$ 6,78	153,4 $\pm$ 5,26
Volume do citoplasma de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	977,2 $\pm$ 77,46 <sup>a</sup>	1089,0 $\pm$ 74,49 <sup>a</sup>	1376,0 $\pm$ 98,73 <sup>b</sup>	1152,0 $\pm$ 64,88 <sup>a</sup>	969,2 $\pm$ 70,34	904,5 $\pm$ 62,30
Volume da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	1124,0 $\pm$ 81,70 <sup>a</sup>	1254,0 $\pm$ 77,94 <sup>a</sup>	1555,0 $\pm$ 96,93 <sup>b</sup>	1338,0 $\pm$ 61,07 <sup>a</sup>	1106,0 $\pm$ 76,59	1058,0 $\pm$ 65,23
Volume da célula de Leydig/T ( $\mu\text{m}^3 \times 10^6$ )	116763,0 $\pm$ 3232,0	104518,0 $\pm$ 15939,0	123907,0 $\pm$ 9805,0	121942,0 $\pm$ 12481,0	140706,0 $\pm$ 19116,0	113615,0 $\pm$ 16055,0
Volume da célula de Leydig/gT ( $\mu\text{m}^3 \times 10^6$ )	32552,0 $\pm$ 873,4	29692,0 $\pm$ 4041,0	33054,0 $\pm$ 2551,0	34424,0 $\pm$ 3585,0	40383,0 $\pm$ 5146,0	31226,0 $\pm$ 4169,0
Número de células Leydig/T ( $\mu\text{m}^3 \times 10^6$ )	105,70 $\pm$ 6,47	82,61 $\pm$ 10,26	81,33 $\pm$ 8,98	91,04 $\pm$ 7,95	130,20 $\pm$ 19,65	106,70 $\pm$ 11,96
Número de células Leydig/gT ( $\mu\text{m}^3 \times 10^6$ )	27,64 $\pm$ 0,63	21,03 $\pm$ 0,39	21,57 $\pm$ 2,14	25,64 $\pm$ 2,01	37,27 $\pm$ 5,30	29,38 $\pm$ 3,17
Índice Leydigossomático (%)*	0,04 $\pm$ 0,008	0,05 $\pm$ 0,008	0,07 $\pm$ 0,003	0,07 $\pm$ 0,009	0,04 $\pm$ 0,005	0,03 $\pm$ 0,004

Dados expressos como média  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos tratado e controle. Teste de Tukey e Dunn's\*: controle, 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G250, 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500, 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias) (n=5/grupo). Teste T: controle recovery, 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G1000R, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação) (n=5/grupo).

### 5.3 – Morfometria epididimária

Os parâmetros morfométricos epididimário, como diâmetro do túbulo, altura do epitélio e diâmetro luminal, foram avaliados nas regiões da cabeça e cauda. Os animais dos grupos G250, G500 e G1000 não tiveram diferenças significativas no diâmetro do túbulo, altura do epitélio e diâmetro luminal em comparação aos animais controle (Tab. 6;  $p > 0,05$ ). Semelhantemente, os animais do grupo *recovery* (controle recovery e G1000R) não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros morfométricos das regiões avaliadas (Tab. 6;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 6.** Morfometria do ducto epididimário de ratos Wistar tratados com extrato etanólico de *A. velutina*.

Região	Parâmetro	Controle	G250	G500	G1000	Controle recovery	G1000R
	Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ )	319,2 $\pm$ 11,98	331,9 $\pm$ 39,36	358,2 $\pm$ 5,86	240,7 $\pm$ 35,49	327,0 $\pm$ 4,21	337,2 $\pm$ 16,62
Cabeça	Altura epitelial ( $\mu\text{m}$ )	38,37 $\pm$ 1,44	41,56 $\pm$ 3,62	31,12 $\pm$ 1,28	36,02 $\pm$ 4,95	33,52 $\pm$ 2,11	34,61 $\pm$ 1,21
	Diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ )*	280,9 $\pm$ 13,32	290,4 $\pm$ 42,71	327,1 $\pm$ 4,95	204,7 $\pm$ 36,43	293,4 $\pm$ 4,87	302,6 $\pm$ 16,02
	Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ )	477,8 $\pm$ 23,15	483,6 $\pm$ 7,94	446,2 $\pm$ 12,31	419,2 $\pm$ 10,38	438,3 $\pm$ 12,94	420,4 $\pm$ 25,61
Cauda	Altura epitelial ( $\mu\text{m}$ )	16,43 $\pm$ 0,76	17,08 $\pm$ 1,08	17,14 $\pm$ 0,56	17,49 $\pm$ 0,71	17,39 $\pm$ 0,76	20,12 $\pm$ 3,23
	Diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ )	461,4 $\pm$ 23,75	466,5 $\pm$ 8,78	429,0 $\pm$ 12,45	401,7 $\pm$ 10,20	421,0 $\pm$ 13,29	400,3 $\pm$ 28,50

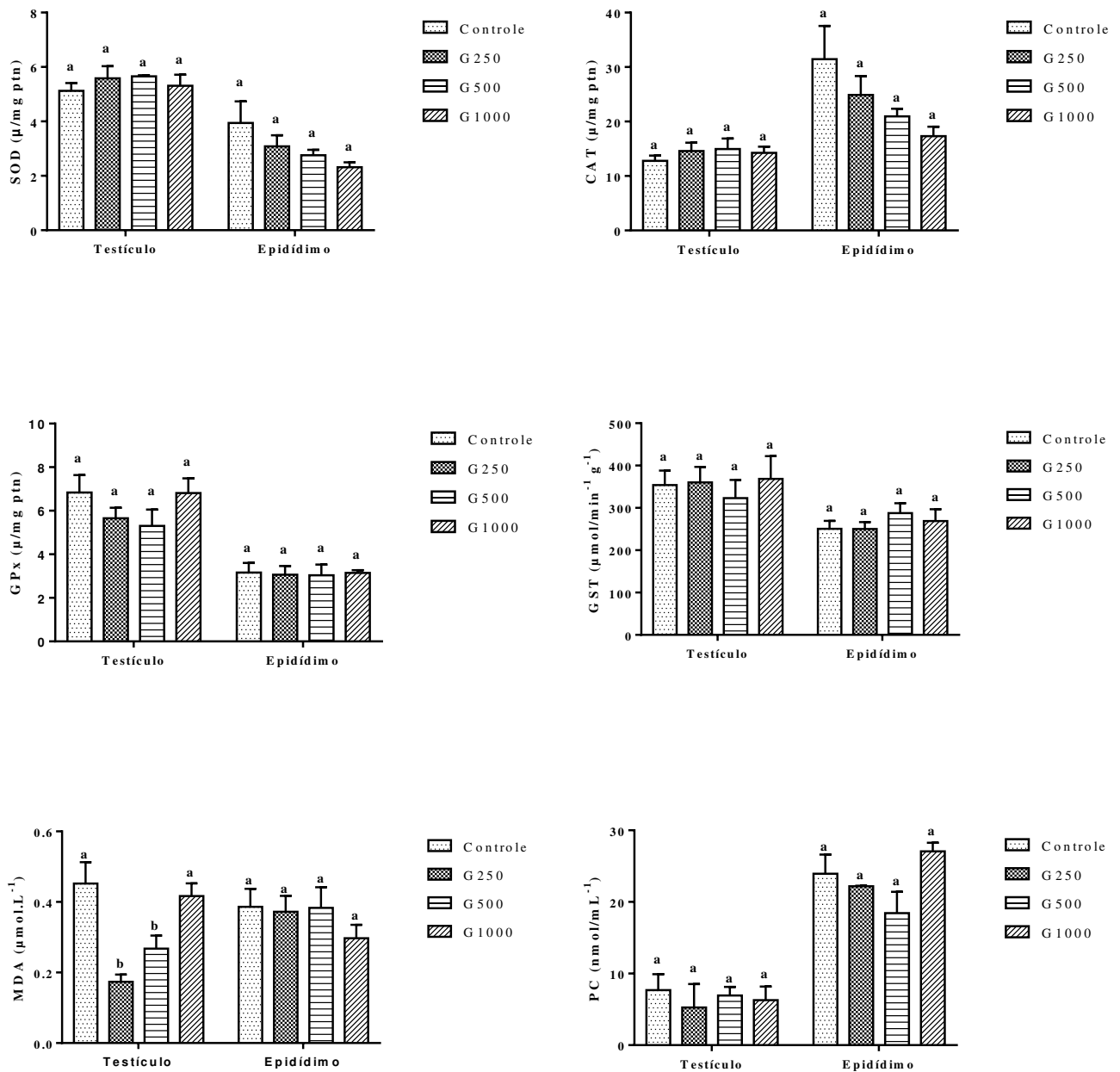
Dados expressos como média  $\pm$  SEM ( $p > 0,05$ ). Teste de Tukeye Dunn's\*: controle, 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G250, 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500, 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias) (n=5/grupo). Teste T: controle recovery, 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G1000R, 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (28 dias + 14 dias de recuperação) (n=5/grupo).

#### 5.4 – Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

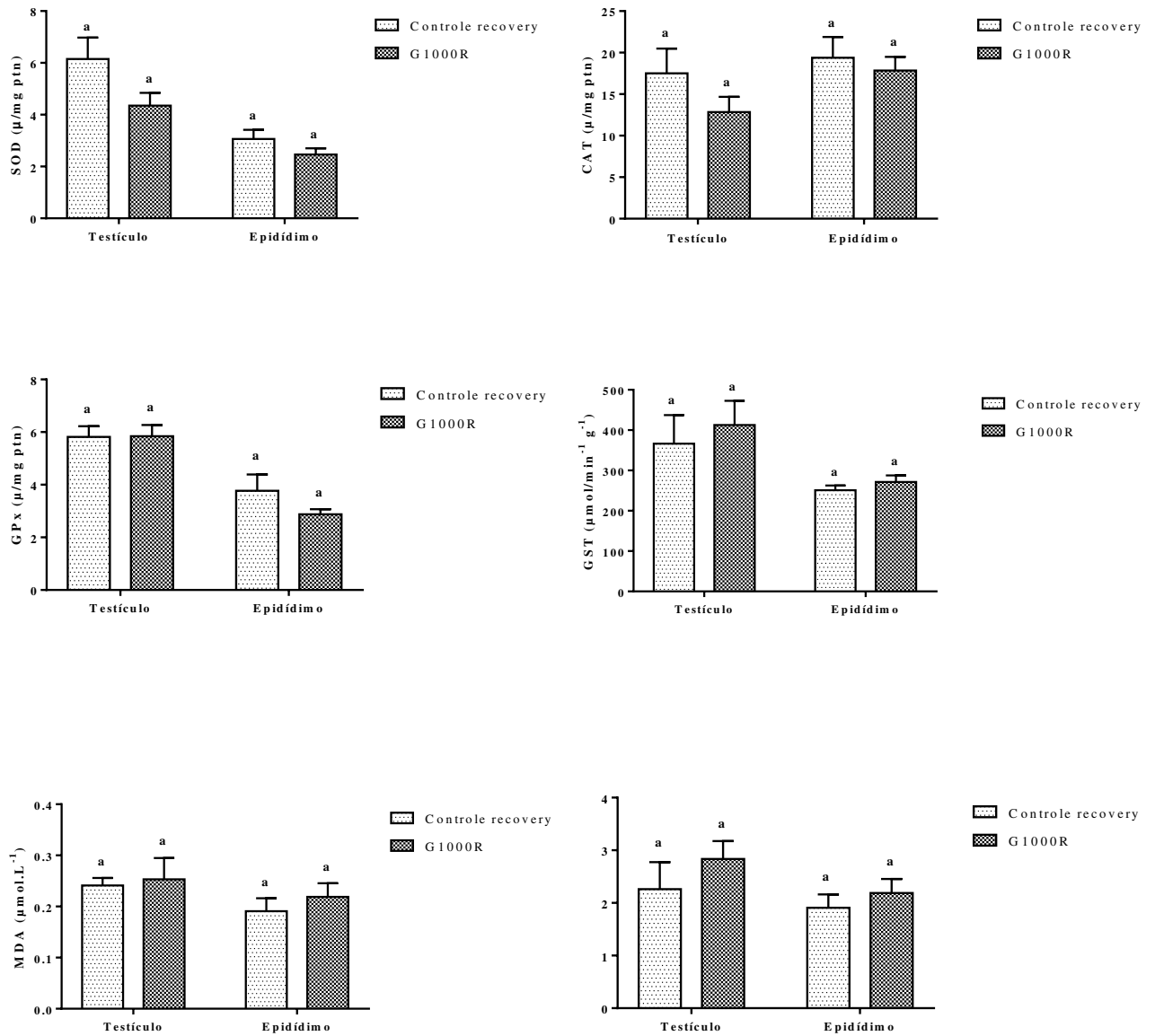
A atividade das enzimas antioxidantes como superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST) no testículo dos animais tratados por 28 dias (G250, G500 e G1000) não apresentou alterações significativas nos tratamentos em comparação ao controle (Fig. 7;  $p > 0,05$ ). Por outro lado, a concentração do malondialdeído (MDA) apresentou redução nos animais tratados com 250 mg/kg ( $p = 0,002$ ) e 500 mg/kg ( $p = 0,03$ ). No entanto, a produção de proteína carbonilada (PC) não foi alterada (Fig. 5;  $P > 0,05$ ).

Nas análises enzimáticas da cauda do epidídimo nesses grupos G250, G500 e G1000, não foram observadas alterações na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST), assim como nos marcadores de estresse oxidativo (MDA e PC) (Fig. 7;  $p > 0,05$ ).

Nos animais do grupo *recovery* não houveram alterações nas enzimas antioxidantes e nem nos marcadores de estresse oxidativo, tanto no testículo quanto no epidídimo (Fig. 8;  $p > 0,05$ ).



**Figura 7.** Enzimas antioxidantes e marcadores relacionadas ao estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos, testículo e epidídimo, de ratos Wistar adultos submetidos ao extrato etanólico de *A. velutina* por 28 dias. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutaciona peroxidase; GST: glutaciona S-transferase; MDA: malondialdeído; PC: proteína carbonilada. Controle: 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G250: 250 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G500: 500 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina*; G1000: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* ( $n=5/\text{grupo}$ ). Média  $\pm$  SEM. <sup>a, b</sup> Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos tratados e controle pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Enzimas antioxidantes e marcadores relacionadas ao quadro de estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos, testículo e epidídimo, de ratos Wistar adultos submetidos ao extrato etanólico de *A. velutina* por 28 dias e observados por mais 14 dias. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutaciona peroxidase; GST: glutaciona S-transferase; MDA: malondialdeído; PC: proteína carbonilada); Controle *recovery*: 600  $\mu\text{L}$  de PBS e 1% de DMSO; G1000R: 1000 mg/kg de extrato etanólico de *A. velutina* (n=5/grupo). Média  $\pm$  SEM. Sem diferenças significativas entre as medidas pelo teste T ( $p > 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o extrato etanólico de *Athenaea velutina* não apresentou toxicidade para órgãos reprodutivos em ratos Wistar machos. Apesar de algumas alterações estereológicas e morfométricas, este estudo mostrou que o extrato de *A. velutina* não afetou negativamente as funções reprodutivas e nem a atividade das enzimas antioxidantes. Pelo contrário, o extrato reduziu as concentrações do marcador de peroxidação lipídica (malondialdeído - MDA) no testículo dos animais tratados com 250 mg/kg e 500 mg/kg do extrato vegetal.

A falta de alterações clínicas, incluindo o consumo de água e ração e o comportamento animal, assim como de alterações biométricas, indica que o extrato *A. velutina* não apresenta efeitos toxicológicos. Os resultados biométricos dos órgãos reprodutivos deste estudo foram similares aos do trabalho com o extrato hidroalcolico de *W. somnifera*, espécie pertencente à mesma subtribo da *A. velutina*, onde não foram observadas alterações nos órgãos dos animais tratados (Prabu et al., 2012). Na toxicologia reprodutiva, a variação na massa das gônadas é evidência para classificar inicialmente se um agente é tóxico à reprodução masculina. Pois essa variação pode estar relacionada a alterações histológicas dos túbulos seminíferos, presença de edema no espaço intersticial e, inclusive, alterações na produção de espermatozoides (Zenick et al., 1994; Mali et al., 2015; Ain et al., 2018).

Na avaliação histopatológica dos túbulos seminíferos dos animais tratados por 28 dias com *A. velutina* foram observadas poucas alterações teciduais, como a presença de vacúolos na base e no ápice do epitélio seminífero dos ratos tratados com a dose de 1000 mg/kg do extrato vegetal. Contudo, a microestrutura tecidual do interstício apresentou-se normal em todos os animais tratados, sem alterações evidentes sobre as células de Leydig e sobre os componentes intersticiais. A vacuolização intraepitelial é uma resposta comum a agentes tóxicos, ocorrendo principalmente no citoplasma das células de Sertoli. Segundo Dias et al. (2019), as alterações podem ser classificadas em normal, leve, moderada ou severa, e apesar do aumento de patologias moderadas nos animais G1000, não houve danos na espermatogênese, uma vez que as enzimas antioxidantes e os marcadores de estresse oxidativo não foram alterados. Assim, os vacúolos encontrados neste estudo podem estar relacionados ao processo fisiológico normal do tecido.

No caso do epidídimo, a administração do extrato vegetal não alterou a histologia das regiões de cabeça e cauda, bem como os parâmetros morfométricos. Esse órgão é responsável pela capacitação e maturação espermática, sendo subdividido em segmento inicial, cabeça,

corpo e cauda, essas regiões possuem células especializadas na função de secreção, absorção de proteína, endocitose e exocitose, acidificação do fluido luminal e defesa imunológica e fagocitária (Da Silva et al., 2011; Shum et al., 2014; Ross & Pawlina, 2016). As variações histopatológicas testiculares e epididimárias são descritas em modelos animais tratados com extratos de plantas, principalmente quando relacionadas à infertilidade masculina (Bajaj & Gutpa, 2011; Chenniappan & Murugan, 2017; Ain et al., 2018). No entanto, diversos trabalhos relatam melhoras decorrentes do uso de extratos de plantas, como *W. somnifera*, na reprodução masculina, principalmente na redução de danos teciduais ocasionados por agentes exógenos (Kumar et al., 2015b; Bhargavan et al., 2015; Dias et al., 2018; Mouro et al., 2020).

O extrato etanólico de *A. velutina* administrado por 28 dias nos ratos não alterou o percentual de testículo (%), de epitélio (%) e o índice tubulossomático (%). Por outro lado, o índice epitéliossomático aumentou nos animais G500, o aumento deste parâmetro pode refletir na produção espermática, considerando que o mesmo está relacionado ao processo espermatogênico (Damasceno, 2017). Dias et al. (2019) associaram que o aumento deste índice está relacionado a expansão das células germinativas.

O volume de túbulos (mL), epitélio (mL) e lúmen (mL) em todos os tratamentos também não foram alterados. Em um trabalho realizado com ratos, utilizando uma infusão de *Heteropterys afrodisiaca*, também não foram observadas variações nos mesmos parâmetros reprodutivos (Gomes et al., 2011). A eficiência da produção espermática é afetada pela massa das gônadas, pois este parâmetro está diretamente relacionado ao percentual e ao volume testicular (França & Russell, 1998). O fato desses parâmetros não terem sido alterados sugere que o processo espermatogênico não sofreu danos e sua atividade permaneceu inalterada (Souza et al., 2016a).

O percentual da túnica própria (%) foi maior nos animais pertencentes aos grupos G500 e G1000, no entanto somente o volume da túnica própria nos animais G500 apresentou aumento. O percentual do lúmen (%) nos animais dos grupos G500 e G1000 sofreu redução, isso ocorreu porque houve aumento da altura do epitélio seminífero e nos parâmetros da túnica própria. A túnica própria é composta por células mioídes e fibrilas colágenas. As células mioídes são ricas em retículo endoplasmático rugoso (RER) e sintetizam colágeno na ausência de fibroblasto típico, e são também responsáveis pela contração rítmica que cria ondas peristálticas que auxiliam na movimentação dos espermatozoides e do líquido testicular, através dos túbulos seminíferos até os ductos excretórios (Ross & Pawlina, 2016; Losinno et al., 2016).

O aumento da túnica própria pode estar relacionado a fatores estimulatórios encontrados no extrato vegetal. Um fator importante que pode ter influenciado o aumento da túnica própria é a secreção de ocitocinas, as quais são produzidas pelas células de Leydig, existindo estudos que relatam essa capacidade estimulatória (Tahtamouni et al., 2016; Ephraim et al., 2019). Por outro lado, os animais *recovery* não apresentaram diferença no percentual e volume, o que sugere uma reversibilidade das alterações na túnica própria encontradas no grupo tratado por 28 dias.

Os tratamentos não influenciaram o comprimento total de túbulo (CTT/T), o comprimento total de túbulo por grama de testículo (CTT/Tg), a área do túbulo e a área do epitélio dos animais tratados por 28 dias. Conseqüentemente, o diâmetro do túbulo também não foi alterado, já que alterações nos componentes citados afetam o diâmetro tubular, e, caso houvesse variações nas dimensões dos túbulos seminíferos, a produção de espermatozoides poderia ser afetada diretamente (Ajayi et al., 2009; Dias et al., 2019).

Por outro lado, a altura do epitélio dos animais dos grupos G500 e G1000 aumentou significativamente, e foi acompanhada por diminuição do diâmetro do lúmen nos animais do grupo G500, e, apesar de não significativa, houve também uma tendência de redução do diâmetro do lúmen nos animais do grupo G1000 ( $p = 0,1$ ). Assim, o aumento na altura do epitélio foi contraposto pela redução no diâmetro luminal, de modo que não houve mudança no diâmetro do túbulo. Entretanto, essa variação na altura epitelial afetou diretamente a relação túbulo-epitélio (T/E), a qual foi menor nos animais dos grupos G500 e G1000. O epitélio seminífero é composto por células da linha germinativa e células de Sertoli, as quais compõem um ambiente altamente organizado e especializado, para que o processo de espermatogênese ocorra de forma adequada (Lara et al., 2018). Em um trabalho com animais tratados com extrato etanólico de *Hypoxis hemerocallidea* foi observado aumento na altura do epitélio seminífero, sem alterações no diâmetro do túbulo, sugerindo que este aumento possa estar relacionado com o aumento da atividade meiótica e/ou mitótica das células germinativas, com aumento na eficiência da dinâmica espermatogênica e no número de espermatozoides (Tiya et al., 2016).

Em relação aos mesmos parâmetros nos animais *recovery*, foi observado que não houve alterações morfométricas, sugerindo que, após a interrupção do tratamento, essas medidas foram restabelecidas. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Singh & Singh (2015) com extrato de *Citrus limon*, no qual houve uma redução dos parâmetros morfométricos avaliados, no entanto, após a interrupção do tratamento, os parâmetros foram restabelecidos.

A região intersticial do testículo pode ser bastante afetada por agentes xenobióticos (Blanco et al., 2007; Souza et al., 2016a). A ausência de alterações histológicas na região intersticial e a manutenção do percentual dos componentes intersticiais (%), tanto nos animais tratados por 28 dias quanto nos animais *recovery*, sugerem que o extrato de *A. velutina* não afeta os componentes intersticiais.

Neste trabalho, foi observado aumento no diâmetro e no volume nuclear das células de Leydig dos animais do grupo G1000. Ainda, aumento significativo da proporção volumétrica e de células de Leydig foi observado nos animais do grupo G500. O aumento do diâmetro e volume das células de Leydig pode estar associado à alta atividade metabólica da célula (Danian & Lung, 2002). O citoplasma das células de Leydig é rico em retículo endoplasmático liso (REL), local de síntese dos esteroides gonadais, cuja produção e liberação é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) (Machado-Neves et al., 2018). Assim, o aumento dos parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig pode estar associado a um possível aumento das concentrações séricas do LH. O aumento nesses parâmetros está em conformidade com o aumento da túnica própria e da altura do epitélio seminífero, tendo sido descrito que as células de Leydig regulam esses parâmetros e sua função na espermatogênese (Collin & Bergh, 1996; Tahtamouni et al., 2016; Ephraim et al., 2019). Em contrapartida, os animais *recovery* não apresentaram qualquer alteração na morfometria e estereologia das células de Leydig, indicando que após a interrupção do tratamento estes parâmetros não alteraram.

Apesar das alterações observadas na morfometria e estereologia das células de Leydig, o índice leydigossomático (ILS) não sofreu alteração. O ILS quantifica o investimento em células de Leydig no testículo, em relação à massa corporal (Dias et al., 2020). As células de Leydig são responsáveis pela síntese de testosterona no testículo a partir do colesterol, hormônio fundamental à espermatogênese, além de exercer um papel nos processos endócrinos sistêmicos, androgênicos e anabólicos, fora do testículo (Teerds & Huhtaniemi, 2015; Wang et al., 2017). Ainda que o ILS não tenha se alterado nos animais tratados, sabe-se que um pequeno incremento na produção e liberação hormonal pode exercer efeitos significativos nos tecidos alvo.

O extrato de *A. velutina* não alterou a atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST no testículo e epidídimo dos animais tratados por 28 dias e nem dos animais *recovery*, o que significa que não houve alteração nos mecanismos antioxidante. As enzimas de controle de radicais livres (SOD, CAT, GPx e GST) são a primeira linha de defesa contra lesões oxidativas nos órgãos reprodutivos, principalmente por agentes exógenos provenientes de plantas (Zhong

& Zhou, 2013). A manutenção da atividade enzimática, com manutenção ou redução dos marcadores de stress oxidativo, refletiu nos parâmetros patológicos, pois não houveram danos teciduais consideráveis, assim como nos parâmetros histológicos e morfométricos, que foram mantidos dentro da normalidade ou até mesmo tiveram incrementos positivos.

Vale salientar que não houve alteração nos níveis de proteína carbonilada no testículo dos grupos tratados, e que houve redução nas concentrações de malondialdeído (MDA) nos animais tratados com as doses de 250 mg/kg (G250) e 500 mg/kg (G500), indicando que o extrato de *A. velutina* possa regular a peroxidação lipídica. O MDA é o principal marcador de estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos, é formado a partir de peroxidação dos lipídios da membrana plasmática das células, e em altas concentrações pode ocasionar danos aos tecidos, prejudicando as funções reprodutivas (Janero, 1990).

Segundo o modelo proposto por Sengupta et al. (2017), a *W. somnifera* afeta positivamente os mecanismos oxidativos, principalmente no plasma seminal e nas células germinativas, aumentando a atividade de SOD e CAT, o teor de vitaminas A, E e C, e os níveis de íons metálicos essenciais como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Au}^{2+}$ . Outro estudo, utilizando o extrato de *W. somnifera*, descreveu uma melhora na qualidade espermática, reduzindo os níveis de radicais livres e a morte celular, além de aumentar as concentrações dos íons metálicos essenciais (Shukla et al., 2011). Dessa forma, é possível inferir que *A. velutina*, que faz parte da mesma subtribo que *W. somnifera*, também possua essas propriedades regulatórias sobre os mecanismos oxidativos.

Por outro lado, o estudo de Kumar & Singh (2018) com extrato de *W. somnifera* não mostrou alterações na atividade enzimática de SOD, CAT e GPx e nem nas concentrações de MDA durante o período de tratamento, e após a interrupção do tratamento a atividade da SOD, CAT e GPx foi reduzida e houve aumento da peroxidação lipídica. Esses resultados foram diferentes daqueles encontrados neste trabalho, pois após a interrupção do tratamento, a atividade das enzimas antioxidantes e os marcadores de estresse oxidativo nos animais *recovery* não foram alterados, o que mostra que o extrato de *A. velutina* não possui efeitos toxicológicos tardios.

A composição fitoquímica do extrato de *Athenaea velutina* mostra os vitanolídeos como os principais constituintes bioativos (Prazeres, 2020; Almeida, 2019). Este é o primeiro trabalho que descreve a ação do extrato vegetal sobre as funções reprodutivas. Apesar dos resultados encontrados neste trabalho sugerirem que o extrato de *A. velutina* seja benéfico ao aparelho reprodutor masculino, não apresentando toxicidade para a reprodução, ainda são necessários

mais estudos para avaliação de alguns parâmetros reprodutivos acerca do potencial dessa planta, principalmente sobre o processo espermatogênico, especificamente sobre a qualidade, viabilidade, motilidade e morfologia dos espermatozoides, além da quantificação de íons metálicos e das concentrações de testosterona, FSH e LH.

## 7. CONCLUSÕES

O extrato etanólico de *Athenaea velutina* promove incrementos em parâmetros morfométricos e estereológicos de túbulo seminífero e interstício testicular de ratos Wistar, e regula para baixo as concentrações do principal marcador de peroxidação lipídica, o malondialdeído, particularmente nas doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg. O extrato não causou alterações nos órgãos após a interrupção da sua ingestão. Logo, o extrato de *A. velutina* não possui efeitos toxicológicos sobre a reprodução. São necessários mais estudos para avaliar outros parâmetros reprodutivos e assim confirmar o potencial positivo dessa planta sobre a fertilidade masculina.

## 8. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMAD, M. K., MAHDI, A. A., SHUKLA, K. K., ISLAM, N., RAJENDER, S., MADHUKAR, D., AHMAD, S. *Withania somnifera* improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 3, p. 989-996, 2010.
- AHMED, E., ARSHAD, M., KHAN, M. Z., AMJAD, M. S., SADAF, H. M., RIAZ, I., SABIR, S. AHMAD, N. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, p. 205-214, 2017.
- AHMED, W., MOFED, D., ZEKRI, A. R., EL-SAYED, N., RAHOUMA, M., SABET, S. Antioxidant activity and apoptotic induction as mechanisms of action of *Withania somnifera* (Ashwagandha) against a hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 4, p. 1358-1369, 2018.
- AITKEN, R. J., ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. In *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. **Springer**, New York, NY, p. 154-171, 2008.
- AIN, Q. U., DAVID, M., SHAH, Q., AHMAD, M., JAHAN, S. Antifertility effect of methanolic leaf extract of *Chenopodium ambrosioides* Hook. in male Sprague Dawley rats. **Andrology**, v. 50, n. 10, p. 13129, 2018.
- AJAYI, A. F., RAJI, Y., TOGUN, V., OYEWOPO, A. O. Caudal epididymal sperm characteristics and testicular morphometrics of rabbits fed graded levels of a blood-wild

sunflower leaf meal (BWSLM) mixture diet. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1- 9, 2009.

ALMEIDA, A. A. **Estudo fitoquímico e da atividade antimelanoma de *Aureliana velutina* Sendtn. (Solanaceae)**. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.

ALMEIDA, A. A., LIMA, G. D., SIMÃO, M. V., MOREIRA, G. A., SIQUEIRA, R. P., ZANATTA, A. C., VILEGAS, W., MACHADO-NEVES, M., LEITE, J. P. Screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Athenaea velutina* (Solanaceae) as a novel source of antimetastatic agents. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 00, p. 1–16, 2020.

ALMEIDA-LAFETÁ, R. C., FERREIRA, M. J. P., EMERENCIANO, V. P., KAPLAN, M. A. C. Withanolides from *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, n. 12, p. 2478-2487, 2010.

AMANN, R. P. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit. **Journal Andrology**, v. 29, p 469–487, 2008.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. D., SOUZA, R. B. D., SANTOS, S. A. D., ANDRADE, D. R. D. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia para com condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Versão 2**. Brasília, p. 1-48, 2013.

ASHIDI, J. S., OWAGBORIAYE, F. O., YAYA, F. B., PAYNE, D. E., LAWAL, O. I., OWA, S. O. Assessment of reproductive function in male albino rat fed dietary meal supplemented with *Mucuna pruriens* seed powder. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. 02716, 2019.

ATTAL, J., COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenesis chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, 3:219-241, 1963.

BAJAJ, V. K., GUPTA, R. S. Fertility suppression in male albino rats by administration of methanolic extract of *Opuntia dillenii*. **Andrology**, v. 44, p. 530-537, 2011.

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**, v. 1, n. 29, p. 113–123, 2006.

BELTRÁN-RODRÍGUEZ, L., ORTIZ-SÁNCHEZ, A., MARIANO, N. A., MALDONADO-ALMANZA, B., REYES-GARCÍA, V. Factors affecting ethnobotanical knowledge in a mestizo community of the Sierra de Huautla Biosphere Reserve, Mexico. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 1, p. 14, 2014.

BIANCHINI, R. F. Processamento de plantas medicinais. **Caderno Técnico-Didático**, Associação Catarinense de Plantas Medicinais (ACPM), v. 1, p. 47-54, 2011.

BHARGAVAN, D., DEEPA, B., SHETTY, H., KRISHNA, A. P. The protective effect of *Withania somnifera* against oxidative damage caused by ethanol in the testes of adult male

rats. **International Journal of Basic and Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 1104-1108, 2015.

BLANCO, A., MOYANO, R., VIVO, J., FLORES-ACUÑA, R., MOLINA, A., BLANCO, C., AGÜERA, E., MONTERDE, J. G. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 96-101, 2007.

CAO, C. M., WU, X., KINDSCHER, K., XU, L., TIMMERMANN, B. N. Withanolides and sucrose esters from *Physalis neomexicana*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 10, p. 2488-2493, 2015.

CICHOSKI, A. J., ROTTA, R. B., SCHEUERMANN, G., CUNHA JÚNIOR, A., BARIN, J. S. Investigation of glutathione peroxidase activity in chicken meat under diferente experimental conditions. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 32, n. 4, p. 661-667, 2012.

CHEN, L. X., XIA, G. Y., HE, H., HUANG, J., QIU, F., ZI, X. L. New withanolides with TRAIL-sensitizing effect from *Physalis pubescens* L. **RSC advances**, v. 6, n. 58, p. 52925-52936, 2016.

CHEN, H., GE, R. S., ZIRKIN, B. R. Leydig cells: from stem cells to aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, v. 1-2, p. 9-16, 2009.

CHENNIAPPAN, K., MURUGAN, K. Therapeutic and fertility restoration effects of *Ionidium suffruticosum* on sub-fertile male albino Wistar rats: effects on testis and caudal spermatozoa. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 946-957, 2017.

CHIARINI-GARCIA, H., RAYMER, A. M., RUSSELL, L. D. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. **Reproduction-cambridge**, v. 126, n. 5, p. 669-680, 2003.

COLLIN, O., DAMBER, J. E., BERGH, A. 5-Hydroxytryptamine—a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. **Reproduction**, v. 106, n. 1, p. 17-22, 1996.

COLLIN, O., BERGH, A. Leydig cells secrete factors which increase vascular permeability and endothelial cell proliferation. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 4, p. 221-228, 1996.

COMHAIR, S. A., ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.

CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, p. 213-27, 2009.

COSENTINO, M.J., COCKETT, A.T.K. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. **Urological Research**, v. 14, p. 229-240, 1986.

CREASY, D. M. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 64–76, 2001.

DACHEUX, J. L., DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. R27-R42, 2014.

DAMASCENO, E. M. **Effects of alcoholic extract of clove vine *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae) on tests of adult Swiss mice**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural), Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

DAMASCENO, D. C., VOLPATO, G. T., CALDERON, I. M. P., RUDGE, M. V. C. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clinical**, v. 5, n. 5, p. 355-361, 2002.

DA-NIAN, Q. I. N., LUNG, M. A. Morphometric study on Leydig cells in capsulotomized testis of rats. **Asian Journal Andrology**, v. 4, p. 49-53, 2002.

DA SILVA, C. V., BORGES, F. M., VELOZO, E. S. Phytochemistry of some Brazilian plants with aphrodisiac activity. **Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, n. 15, p. 307-326, 2012.

DA SILVA, N., CORTEZ-RETAMOZO, V., REINECKER, H. C., WILDGRUBER, M., HILL, E., BROWN, D., SWIRSKI, F. K., PITTET, M. J., BRETON, S. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 141, n. 5, p. 653-663, 2011.

DE ALMEIDA LIMA, G. D., SERTORIO, M. N., SOUZA, A. C. F., MENEZES, T. P., MOURO, V. G. S., GONÇALVES, N. M., MACHADO-NEVES, M. Fertility in male rats: disentangling adverse effects of arsenic compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 78, p. 130-140, 2018.

DE CARVALHO, L. D. Á., COSTA, L. H. P., DUARTE, A. C. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das solanáceas que ocorrem no Sudeste Brasileiro (*Acnistus*, *Athenaea*, *Aureliana*, *Brunfelsia* e *Cyphomandra*). **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 31-45, 2001.

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; p. 291-296, 1985.

DHANANI, T., SHAH, S., GAJBHIYE, N. A., KUMAR, S. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1193-S1199, 2017.

DIAS, F. C. R., MARTINS, A. L. P., DE MELO, F. C. S. A., DO CARMO CUPERTINO, M., GOMES, M. D. L. M., DE OLIVEIRA, J. M., DA MATTA, S. L. P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 179-189, 2019.

DIAS, F. C. R., GOMES, M. D. L. M., DE MELO, F. C. S. A., MENEZES, T. P., MARTINS, A. L., DO CARMO CUPERTINO, M., OTONI W. C., DA MATTA, S. L. P. *Pfaffia glomerata* hydroalcoholic extract stimulates penile tissue in adult Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113182, 2020.

DORST, V. J., SAJONSKI, H. Morphometrische Untersuchungen am Tubulussystem des Schweinehodens während der postnatalen. **Entwicklung Monatshefte für Veterinärmedizin**, v. 29, p. 650-652, 1974.

EPHRAIM, U. N., GODWIN, U. U., EFIOM, O. E., BASSEY, A. A. Effect of Ethanolic Extract of *Icacinia manni* Tuber on the Reproductive Parameters of Male Rats. **American Journal of Health Research**, v. 7, n. 5, p. 89-99, 2019.

FATTAHI, E., MOUSAVI MOGHADAM, M., KHANBABAEI, R. The effect of tricyclazole on testosterone changes and testicular structure in mice. **Journal of Babol University of Medical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 43-49, 2014.

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**, v. 146, p. 536–542. 2013.

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

FRANÇA, L. R., HESS, R. A., DUFOUR, J. M., HOFMANN, M. C., GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**, v. 4, p. 189-212, 2016.

FRANÇA, L. R., AVELAR, G. F., ALMEIDA, F. F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300- 318, 2005.

FRANÇA, L. R., RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. **Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview, Churchill communications**, Madrid, p. 198-219, 1998.

GHOSAL, S., CHAKRABORTY, I., PRADHAN, N. K. *Jussiaea repens* (L) induced morphological alterations in epididymal spermatozoa of rat. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 22, n. 2, p. 288-295, 2013.

GORELICK, J., ROSENBERG, R., SMOTRICH, A., HANUŠ, L., BERNSTEIN, N. Hypoglycemic activity of withanolides and elicited *Withania somnifera*. **Phytochemistry**, v. 116, p. 283-289, 2015.

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**, v. 3, n. 44, p. 235-241, 2011.

GOMEZ, M., LUCENA, E. A. R. M. D., GOMBERG, E. Analysis of ethnobotanical publications on medicinal plants of the forest Atlantic in the South of Bahia, Brazil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 95-219, 2016.

GRISWOLD, M. D. Sertoli Cell Biology. **Elsevier Academic Press**, Oxford, p. 233-241, 2015.

GUERRIERO, G., BERNI, R., MUÑOZ-SANCHEZ, J. A., APONE, F., ABDEL-SALAM, E. M., QAHTAN, A. A., ALATAR, A. A., CANTINI, C., CAI, G., HAUSMAN, J., SIDDIQUI, K. S., HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T., FAISAL, M. Production of plant secondary

metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. **Genes**, v. 9, n. 6, p. 309, 2018.

GUPTA, M., KAUR, G. *Withania somnifera* (L.) Dunal ameliorates neurodegeneration and cognitive impairments associated with systemic inflammation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-18, 2019.

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**, v. 2, n. 7, p. 1–13. 2007.

HABIG, W. H., PABST, M. J., JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first 330 enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 331 22, p. 7130–9, 1974.

HAFEZ, E. S. E., JAINUDEEN, M. R., ROSNINA, Y. Reprodução Animal. **Manole**, capítulo 3, Ed. Barueri, SP, v. 7, p. 33-53, 2004.

HAGHMORAD, D., MAHMOUDI, M. B., HAGHIGHI, P., ALIDADIANI, P., SHAHVAZIAN, E., TAVASOLIAN, P., MAHMOUDI, H. MAHMOUDI, M. Improvement of fertility parameters with *Tribulus terrestris* and *Anacyclus pyrethrum* treatment in male rats. **International Brazilian Journal Urological**, v. 45, n. 5, p. 1043-1054, 2019.

HAMMAMI, I., ALI, R. B., NAHDI, A., KALLECH-ZIRI, O., BOUSSADA, M., EL MAY, A., EL MAY, M. V. Chronic consumption of *Hypericum humifusum* leaf extracts impairs epididymis spermatozoa characters in association with oxidative stress in adult male Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 616-625, 2017.

HESS, R. A., VOGL, A. W. Sertoli cell anatomy and cytoskeleton. *In*: Griswold M, editor. Sertoli Cell Biology. **Elsevier Academic Press**; Oxford; p. 1–55, 2015.

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.

HOLLY, M. K., DIAZ, K., SMITH, J. G. Defensins in viral infection and pathogenesis. **Annual review of virology**, v. 4, p. 369-391, 2017.

HUANG, M., HE, J. X., HU, H. X., ZHANG, K., WANG, X. N., ZHAO, B. B., LOU, H. X., REN, D. M., SHEN, T. Withanolides from the genus *Physalis*: a review on their phytochemical and pharmacological aspects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 649-669, 2019.

HU, J., MERRINER, D. J., O'CONNOR, A. E., HOUSTON, B. J., FURIC, L., HEDGER, M. P., O'BRYAN, M. K. Epididymal cysteine-rich secretory proteins are required for epididymal sperm maturation and optimal sperm function. **MHR: Basic Science of Reproductive Medicine**, v. 24, n. 3, p. 111-122, 2018.

HU, X. F., ZHANG, Q., ZHANG, P. P., SUN, L. J., LIANG, J. C., MORRIS-NATSCHKE, S. L., CHEN, Y., LEE, K. H. Evaluation of in vitro/in vivo anti-diabetic effects and identification of compounds from *Physalis alkekengi*. **Fitoterapia**, v. 127, p. 129-137, 2018.

JANDÚ, J. J., MORAES NETO, R. N., ZAGMIGNAN, A., DE SOUSA, E. M., BRELAZ-DE-CASTRO, M. C., DOS SANTOS CORREIA, M. T., DA SILVA, L. C. Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 671, 2017.

JAYANTHI, M. K., PRATHIMA, C., HURALIKUPPI, J. C., SURESHA, R. N., DHAR, M. Anti-depressant effects of *Withania somnifera* fat (Ashwagandha ghrutha) extract in experimental mice. **International Journal Pharma Bio Sciences**, v. 3, p. 33, 2012.

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**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 1970.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 15, p. 137. 1965.

KASPATE, D., ZIYAURRAHMAN, A., SALDANHA, T., MORE, P., TORASKAR, S., DARAK, K., NARKHEDE, S. To study an aphrodisiac activity of hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* dried roots in female Wistar rats. **Proceedings of the International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, p. 2820, 2015.

KAUR, P., KAUR, G., BANSAL, M. P. Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: role of transcription factor NF- $\kappa$ B and testicular antioxidant enzymes. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 479-484, 2006.

KEILIN, D., HARTREE, E. F. Inhibitors of catalase reaction. **Nature**, v. 134, p. 933, 1934.

KEMPINAS, W. G., KLINEFELTER, G. R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. 979-114, 2014.

KINNULA, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, v. 60, n. 8, p. 693-700, 2005.

KLINEFELTER, G. R. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. *In*: 29 Robaire B, Hinton BT, editors. The Epididymis – from molecules to clinical practice. 30 New York: **Kluwer Academic/Plenum Publisher**, p. 353-369, 2002.

KNAPP, S. On ‘various contrivances’: pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1539, p. 449-460, 2010.

KUJALA, M., HIHNALA, S., TIENARI, J., KAUNISTO, K., HÄSTBACKA, J., HOLMBERG, C., KERE, J., HOGLUND, P. Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. **Reproduction**, v. 133, n. 4, p. 775-784, 2007.

KUHLMANN, M. Frutos e sementes do Cerrado: espécies atrativas para a fauna. **Brasília: M. K. Peres**, v. 2, p. 464, 2018.

KUMAR, V., DEY, A., HADIMANI, M. B., EMERALDJAVASCRIPT, M. Chemistry and pharmacology of *Withania somnifera*: An update. **Tang**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015a.

KUMAR, P., SINGH, P. Delayed response of epididymal sperm characteristics and testicular oxidative stress following EGME exposure: Ameliorating potential of *Withania somnifera* root extract. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, p. 122-8, 2018.

KUMAR, J., MITRA, M. D., HUSSAIN, A., KAUL, G. Exploration of immunomodulatory and protective effect of *Withania somnifera* on trace metal oxide (zinc oxide nanoparticles) induced toxicity in Balb/c mice. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 2447-2459, 2019.

KUMAR, A., KUMAR, R., RAHMAN, M. S., IQUBAI, M. A., ANAND, G., NIRAJ, P. K., ALI, M. Phytoremedial effect of *Withania somnifera* against arsenic-induced testicular toxicity in Charles Foster rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 4, p. 355–364, 2015b.

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**, p. 105-116, 2018.

LEVINE, R. L., GARLAND, D., OLIVER, C. N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A. G., AHN, B. W., SHALTIEL, S., STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **In Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, Academic Press, 1990.

LI, R. J., GAO, C. Y., GUO, C., ZHOU, M. M., LUO, J., KONG, L. Y. The Anti-inflammatory activities of two major withanolides from *Physalis minima* via acting on NF- $\kappa$ B, STAT3, and HO-1 in LPS-stimulated RAW264. 7 cells. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 401-413, 2017.

LIMA, G. D. A., SERTORIO, M. N., SOUZA, A. C. F., MENEZES, T. P., MOURO, V. G. S., GONÇALVES, N. M., OLIVEIRA, J. M., HENRY, M., MACHADO-NEVES, M. Fertility in male rats: disentangling adverse effects of arsenic compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 78, p. 130-140, 2018.

LIMA, S., PACHECO, J., MARQUES, A., VELTRI, E., ALMEIDA-LAFETÁ, R., FIGUEIREDO, M., TORRES-SANTOS, E. Leishmanicidal Activity of Withanolides from *Aureliana fasciculata* var. fasciculata. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3160, 2018.

LIU, Y. L., HAN, S. Y., ZHAO, H., LIANG, J., LI, Y. G., WANG, G. Y. Hypoglycemic activity of a saponin isolated from fruit calyx of *Physalis alkekengi* L. var. *francheti* (Mast.) Makino [J]. **Journal of Northeast Normal University** (Natural Science Edition), v. 2, 2010.

LORENZI, H., MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Plantarum**. 2 ed, ISBN: 85-86714-28-3, 2008.

LOSINNO, A. D., SORRIVAS, V., EZQUER, M., EZQUER, F., LÓPEZ, L. A., MORALES, A. Changes of myoid and endothelial cells in the peritubular wall during contraction of the seminiferous tubule. **Cell and Tissue Research**, v. 365, n. 2, p. 425-435, 2016.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR A. L., RABDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 193, p. 265–275, 1951.

MACHADO-NEVES, M., NETO, M. J., MIRANDA, D. C., SOUZA, A. C. F., CASTRO, M. M., SERTORIO, M. N., CARVALHO, T. F., DA MATTA, S. L. P., FREITAS, M. B. Dietary exposure to tebuconazole affects testicular and epididymal histomorphometry in frugivorous

bats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 197-204, 2018.

MALI, P. C., SINGH, A. R., VERMA, M. K., CHAHAR, M. K., DOBHAL, M. P. Contraceptive effects of Withanolide-A in adult male albino rats. **Adv Pharmacology Toxicology**, v. 16, p. 31-44, 2015.

MALIK, T., PANDEY, D. K., DOGRA, N. Ameliorative potential of aqueous root extract of *Withania somnifera* against paracetamol induced liver damage in mice. **Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 89-94, 2013.

MALONE, M. H., ROBICHAUD, R. C. A. Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320–332, 1962.

MARTIN-DELEON, P. A. Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 720–725, 2015.

MEISTRICH, M. L., HESS, R. A. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. **In Spermatogenesis**, Humana Press, Totowa, NJ, p. 299-307, 2013.

MISHRA, R. K., SINGH, S. K. Reversible antifertility effect of aqueous rhizome extract of *Curcuma longa* L. in male laboratory mice. **Contraception**, v. 79, n. 6, p. 479-487, 2009.

MISHRA, R. K., SINGH, S. K. Effect of aqueous leaf extract of *Azadirachta indica* on the reproductive organs in male mice. **Indian journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 1093-103, 2005.

MISRA, A., & SRIVASTAVA, S. Chemotaxonomy: an approach for conservation and exploration of industrially potential medicinal plants. **Journal of Pharmacognosy & Natural Products**, v. 2, p. 108, 2016.

MONTEIRO, J. C., PREDES, F. S., MATTA, S. L., DOLDER, H. Heteropterys aphrodisiaca infusion reduces the collateral effects of cyclosporine A on the testis. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 291, n. 7, p. 809-817, 2008.

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**, v. 11, n. 4, p. 61-7, 2016.

MOREIRA, R., PEREIRA, D. M., VALENTÃO, P., ANDRADE, P. B. Pyrrolizidine alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1668, 2018.

MOURO, V. G. S., DE MELO, F. C. S. A., MARTINS, A. L. P., GOMES, M. D. L. M., DE OLIVEIRA, J. M., DE FREITAS, M. B. D., DA MATTA, S. L. P. *Euterpe oleracea* (Martius) Oil Reverses Testicular Alterations Caused after Cadmium Administration. **Biological Trace Element Research**, p. 1-16, 2020.

NARSING RAO, M. P., XIAO, M., LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1113, 2017.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIHI, F., GOMES, M. L. M., CARVALHO, F. A. R., REIS, A. B., MARTELLO, R., MELO, R. C. N., ALMEIDA, F. R. C. L., CHIARINI-GARCIA, H. Revisiting the human seminiferous epithelium cycle. **Human Reproduction**, v. 32, n. 6, p. 1170-1182, 2017.

NOGUEIRA, R. C., CERQUEIRA, H. F., SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion Ther. Patents**, 20(2): 1-13, 2010.

OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals. **Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (407)**, 3 Oct 2008. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/ocedtg407-2008.pdf>. Acesso em 05 de novembro de 2018.

OLIVEIRA, P. F., ALVES, M. G. Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis. **Ed. Springer**, p.75, 2015.

OLMSTEAD, R. G., BOHS, L., MAGID, H. A., SANTIAGO-VALENTIN, E., GARCIA, V. F., COLLIER, S. M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Taxon**, 57, 1159–1181, 2008.

O'DONNELL, L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. 979623, 2014.

PATEL, K., SINGH, R. B., PATEL, D. K. Pharmacological and analytical aspects of withaferin-A: A concise report of current scientific literature. **Asia Pacific Journal of Reproduction**, v. 2, p. 238-243, 2013.

PICUT, C. A.; REMICK, A. K. Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologist's Perspective. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 1, p. 195–205, 2017.

PRABU, P. C., PANCHAPAKESAN, S., RAJ, C. D. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* roots in Wistar rats. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1169-1178, 2012.

PRAZERES, J. L. **Avaliação da toxicidade oral aguda e de doses repetidas do extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) em ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2020.

QURESHI, A. A., SANGHAI, D. B., PADGILWAR, S. S. Herbal options for contraception: a review. **Pharmacognosy Magazine**, v. 2, n. 8, p. 204, 2006.

RAJASHREE, R., FELIZ MOHESH, M. I., RAVISHANKAR, M. V., SEMBULINGAM, P. Effect of alcoholic extract of *Withania somnifera* linn roots on reproductive organs in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v. 2, n. 1, p. 20-23, 2011.

RAHMAN, I., BISWAS, S.K., KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 222-239, 2006.

- 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**, v. 2, n. 3, p. 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**, v. 3, n. 21, p. 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**, v. 2, n. 6, p. 178–185, 2002.
- ROBAIRE, B., HINTON, B. T., ORGEBIN-CRIST, M. C. The epididymis. *In*: Knobil and Neill's physiology of reproduction. **Academic Press**, p. 1071-1148, 2006.
- RODRIGUES, I. M. C., KNAPP, S., STEHMANN, J. R. The nomenclatural re-establishment of *Athenaea* Sendtn. (Solanaceae) with a nomenclatural synopsis of the genus. **Taxon**, v. 68, n. 4, p. 839-846, 2019.
- ROOIJ, D. G. Organization of the seminiferous epithelium and the cycle, and morphometric description of spermatogonial subtypes (rodents and primates). *In*: The Biology of mammalian spermatogonia. **Springer**, New York, NY, p. 3-20, 2017.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Ross histologia: texto e atlas: correlações com biologia celular e molecular. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2016.
- RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue and Cell**, v. 2, n. 27, p. 129-147, 1995.
- SALTZMAN, W., TARDIF, S. D., RUTHERFORD, J. N. Hormones and reproduction of vertebrates. *In*: Hormones and reproductive cycles in primates. **Ed. Elsevier**, v. 5, p. 1-35, 2010.
- SANG-NGERN, M., YOUN, U. J., PARK, E. J., KONDRATYUK, T. P., SIMMONS, C. J., WALL, M. M., RUF, M., LORCH, S. E., LEONG, E., PEZZUTO, J. M., CHANG, L. C. Withanolides derived from *Physalis peruviana* (Poha) with potential anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 12, p. 2755-2759, 2016.
- SANGEETHA, K. S., UMAMAHESWARI, S., REDDY, C. U. M., KALKURA, S. N. Flavonoids: Therapeutic potential of natural pharmacological agents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 10, p. 3924, 2016.
- SANTOS, A. P. A., PACHECO, S. G. A., TELES, C. B. G. Efeito leishmanicida in vitro do látex de *Croton lechleri* (Euphorbiaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 3, p. 413-418, 2016.
- SATHIYABAMA, M., PARTHASARATHY, R. Withanolide production by fungal endophyte isolated from *Withania somnifera*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 13, p. 1573-1577, 2018.
- SCHIEBER, M., CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Review. **Current Biology**, v. 24, p. 453-462, 2014.

SENGUPTA, P., AGARWAL, A., POGREBETSKAYA, M., ROYCHOUDHURY, S., DURAIRAJANAYAGAM, D., HENKEL, R. Role of *Withania somnifera* (Ashwagandha) in the management of male infertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 36, n. 3, p. 311-326, 2017.

SHAH, V. V., SHAH, N. D., PATREKAR, P. V. Medicinal plants from Solanaceae family. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 6, n. 2, p. 143-151, 2013.

SHARMA, T., BANERJEE, B. D., YADAV, C. S., GUPTA, P., SHARMA, S. Heavy metal levels in adolescent and maternal blood: association with risk of hypospadias. **ISRN Pediatrics**, p. 1-5, 2014.

SHARPE, R. Regulation of spermatogenesis. *In*: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). The physiology of reproduction. **Raven Press**, 2. ed. New York, p. 1363 - 1434, 1994.

SHUM, W. W., SMITH, T. B., CORTEZ-RETAMOZO, V., GRIGORYEVA, L. S., ROY, J. W., HILL, E., PITTEP, M. J., BRETON, S., DA SILVA, N. Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 90, 2014.

SHUM, W. W., RUAN, Y. C., DA SILVA, N., BRETON, S. Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 576–586, 2011.

SHUM, W. W., DA SILVA, N., MCKEE, M., SMITH, P. J., BROWN, D., BRETON, S. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. **Cell**, v. 135, n. 6, p. 1108–1117, 2008.

SIEWERT, A., SALVADOR, R. A., TIL, D., LAMIM, T., AMARAL, V. L. L. Avaliação da Adição de Extratos e Substâncias Isoladas de Plantas com Potencial Antioxidante na Criopreservação de Sêmen Humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 13, n. 2, p. 10-19, 2019.

SILVA, K. N., AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 344-351, 2005.

SINGH, A., DUGGAL, S., SINGH, H., SINGH, J., KATEKHAYE, S. Withanolides: Phytoconstituents with significant pharmacological activities. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**, v. 4, n. 4, p. 229-237, 2010.

SOARES, M. B., BELLINTANI, M. C., RIBEIRO, I. M., TOMASSINI, T. C., DOS SANTOS, R. R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n. 1, p. 107-112, 2003.

SOMAN, S., ANJU, T. R., JAYANARAYANAN, S., ANTONY, S., PAULOSE, C. S. Impaired motor learning attributed to altered AMPA receptor function in the cerebellum of rats with temporal lobe epilepsy: ameliorating effects of *Withania somnifera* and withanolide A. **Epilepsy & Behavior**, v. 27, p. 484-491, 2013.

SOUZA, A. C. F., MARCHESI, S. C., DE ALMEIDA LIMA, G. D., FERRAZ, R. P., SANTOS, F. C., DA MATTA, S. L. P., MACHADO-NEVES, M. Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular histomorphometry and antioxidants enzymes activities in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 171, n. 2, p. 354-362, 2016a.

SOUZA, A. C. F., MARCHESI, S. C., FERRAZ, R. P., LIMA, G. D. A., OLIVEIRA, J. A., MACHADO-NEVES, M. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. **Journal Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 79, p. 274-286, 2016b.

SHUKLA, K. K., MAHDI, A. A., MISHRA, V., RAJENDER, S., SANKHWAR, S. N., PATEL, D., DAS, M. *Withania somnifera* improves semen quality by combating oxidative stress and cell death and improving essential metal concentrations. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 22, n. 5, p. 421-427, 2011.

STEHMANN, J. R., MENTZ, L. A., AGRA, M. F., VIGNOLI-SILVA, M. GIACOMIN, L., RODRIGUES, I. M. C. Solanaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14587>. Acesso 21 março 2020.

SULLIVAN R. Male fertility markers, myth or reality. **Animal Reproduction Science**, 82-83: 341-7, 2004.

SUN, C. P., QIU, C. Y., YUAN, T., NIE, X. F., SUN, H. X., ZHANG, Q., LI, H. X., DING, L. Q., ZHAO, F., CHEN, L. X., QIU, F. Antiproliferative and anti-inflammatory withanolides from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1586-1597, 2016.

TAHTAMOUNI, 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. *In: Veterinary Research Forum. Faculty of Veterinary Medicine*, Urmia University, Urmia, Iran, v. 7, n. 2, p. 89, 2016.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M., MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. **Artmed Editora**, [s.l.], 2017.

TEERDS, K. J., HUHTANIEMI, I. T. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 3, p. 310-328, 2015.

TIYA, S., SEWANI-RUSIKE, C. R., SHAULI, M. Effects of treatment with *Hypoxis hemerocallidea* extract on sexual behaviour and reproductive parameters in male rats. **Andrology**, v. 49, n. 8, p. 12742, 2016.

TRIBESS, B., PINTARELLI, G. M., BINI, L. A., CAMARGO, A., FUNEZ, L. A., DE GASPER, A. L., ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 136-146, 2015.

TROJAN-RODRIGUES, M., ALVES, T. L. S., SOARES, G. L. G., RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. F., MANFEDRINI, V., BENFATO, M. S., KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VIZZOTTO, M., KROLOW, A. C. R., WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E)**, Doc. 316, 16 p., 2010.

WANG, Y., CHEN, F., YE, L., ZIRKIN, B., CHEN, H. Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. **Reproduction**, v. 154, n. 4, p. R111-R122, 2017.

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**, v. 208, n. 1, p. 10–15, 1993.

WINK, M. Introduction: Biochemistry, Role and Biotechnology of Secondary Metabolites (From APR Volume 3). **Annual Plant Reviews**, v. 3, p. 1–17, 2018.

YANG, Y. W., YANG, L., ZHANG, C., GAO, C. Y., MA, T., KONG, L. Y. Physagulide Q suppresses proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating the ROS-JAK2/Src-STAT3 signaling pathway. **RSC Advances**, v. 7, n. 21, p. 12793-12804, 2017.

ZAMBERLAN, P. M., RODRIGUES, I. M., MÄDER, G., CASTRO, L., STEHMANN, J. R., BONATTO, S. L., FREITAS, L. B. Re-evaluation of the generic status of *Athenaea* and *Aureliana* (Withaniinae, Solanaceae) based on molecular phylogeny and morphology of the calyx. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 3, p. 322-334, 2015.

ZENICK, H., CLEGG, E. D., PERREAULT, S. D., KLINEFELTER, G. R., GRAY, L. E. Assessment of male reproductive toxicology. *In: Principles and Methods of Toxicology*. Ed. **AW Hayes**, pp. 949, 1994.

ZHONG, R. Z., ZHOU, D. W. Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. **Journal of Integrative Agriculture**, 12(10), 1826-1838, 2013.

ZHOU, W., DE IULIIS, G. N., DUN, M. D., NIXON, B. Characteristics of the epididymal luminal environment responsible for sperm maturation and storage. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. 59, 2018.

## 9. ANEXO (S)

ANEXO A - Autorização do acesso ao patrimônio genético no Parque do Itacolomi, concedida pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais – IEF-MG

Número da Autorização		Data da Emissão		Prazo de Validade	
011/2019		07/03/2019		07/03/2020	

INFORMAÇÕES DO RESPONSÁVEL E DO PROJETO						
Título do Projeto: "Análise química e avaliação de atividades biológicas da flora do Parque do Itacolomi"						
Instituição: Universidade Federal de Viçosa						
Responsável: João Paulo Vieira Leite						CPF: 86607697334
Logradouro: Rua A						
Nº/KM	95	Complemento	Condomínio Octávio Pacheco	Bairro/Localidade	Jardim dos Vales	
Município	Viçosa	UF	MG	CEP	36570-480	Cx. Postal
Telefone	(31) 3859-3044		Celular	(31) 99611-0066		
E-mail	jyleite@ufv.br					

INTEGRANTES DA EQUIPE			
Nome	Instituição	CPF/RG	Função
Alison Andrade Almeida	UFV	086.167.316-60	Pesquisador
Jordana Luzzi dos Prazeres	UFV	088.958.376-35	Pesquisador
Letícia Vieira Salustiano	UFV	112.155.216-18	Pesquisador

INFORMAÇÕES DAS ATIVIDADES					
TIPO DE ATIVIDADE:	<input type="checkbox"/> Captura	<input checked="" type="checkbox"/> Coleta	<input checked="" type="checkbox"/> Transporte	<input type="checkbox"/> Sem Coleta/Captura	
	<input type="checkbox"/> Abiótica	<input type="checkbox"/> Microorganismos	<input type="checkbox"/> Fungo	<input checked="" type="checkbox"/> Botânica	<input type="checkbox"/> Invertebrados
	<input type="checkbox"/> Anfíbios	<input type="checkbox"/> Répteis	<input type="checkbox"/> Aves	<input type="checkbox"/> Mamíferos	<input type="checkbox"/> Ictiofauna

OBSERVAÇÕES	<p>Esta autorização permite coleta/transporte de material botânico (folhas e ramos) de acordo com a tabela estimativa de coleta que segue em anexo.</p> <p>Esta autorização não permite coleta/transporte de espécies da flora ameaçadas de extinção que constam na Portaria MMA nº443/2014.</p> <p>As campanhas devem ser agendadas com o responsável pela UC, com antecedência mínima de 10 dias das atividades de campo.</p>
-------------	---

LOCAL DA ATIVIDADE - EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL				
Unidade de Conservação	Responsável pela UC	Contato (Telefone e e-mail)	Endereço da UC	Assinatura do Responsável pela UC
Parque Estadual do Itacolomi	Maria Lúcia Coimbra Cristo	tel:31.3551-6283 maria.cristo@semambiente.mg.gov.br maria.cristo@semambiente.mg.gov.br	Rodovia BR 256, Km 98 - Ouro Preto CEP: 35.000-000	
Esta autorização será válida apenas com a autenticação do responsável pela(s) Unidade(s) de Conservação.				



  

LOCAL DA ATIVIDADE - FORA DE UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL (apenas para material botânico)	
Município(s)	Não se aplica

TRANSPORTE - DESTINO DO MATERIAL COLETADO	
Instituição(s)	Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa-MG
Endereço(s)	Avenida Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Viçosa - MG, 36570-900

Outras Observações e Reservas:	
Assinatura do responsável pela Autorização	Número do Processo SIGEINSIPRO - IEF/ASPROP
 Antônio Augusto Melo Malard Diretor Geral do IEF MGP 1.75.14-0	818ED  00000118 2101 2019

Cidade Administrativa Terceiro Minas, Salvo Minas - Assessoria de Planejamento e Projetos Especiais - 1º andar  
 Rodovia João Paulo II, 4143, Bairro Santa Verônica - CEP 31020-900  
 Telefones: (31) 3816-1330 e-mail: 80004848@semambiente.mg.gov.br

Página 1 de 2



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL  
INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS  
ASSESSORIA DE PROGRAMAS E PROJETOS ESPECIAIS

1. Esta autorização não isenta o pesquisador, titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências prévias em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da terra indígena, da unidade de conservação federal, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possuidor ou detentor de algum direito dos limites de unidade de conservação estadual cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso;
2. O pesquisador titular deverá comparecer a administração desta unidade a fim de **CONFIRMAR AS DATAS** das coletivas, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade de conservação, quando for o caso;
3. O Instituto Estadual de Florestas não se responsabiliza por qualquer dano a equipamentos, ambientes ou locais locais ou pesquisas, estando ainda, o pesquisador responsável e sua equipe ciente da vulnerabilidade da área de realização da pesquisa;
4. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior;
5. O titular da autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura desconhecidos, sempre que possível ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos e empregar esforços de coleta ou captura que não comprometam a viabilidade da população do grupo taxonômico de interesse em condições in situ, quando for o caso;
6. Esta autorização não permite captura/coleta/transporte:
  - para fins comerciais, industriais ou esportivos;
  - para realização de atividades incompatíveis com o processo de licenciamento ambiental de empreendimentos, conforme resolução do CONAMA de nº 237 de 19/11/97, salvo quando especificado;
  - de espécies ameaçadas de extinção em lista oficial federal, salvo quando consistir de projeto específico autorizado pelo SIBIC;
  - de espécies ameaçadas de extinção em lista oficial estadual, salvo quando consistir de projeto específico autorizado pelo IEF;
  - de fauna e flora em áreas de domínio privado, sem o consentimento expresso do titular do proprietário nos termos do Código Civil;
7. Esta autorização não permite transporte intranacional e internacional de material biológico;
8. Esta autorização não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Veja maiores informações em [www.conama.gov.br/](http://www.conama.gov.br/);
9. O titular desta autorização, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inobservância, mesmo que haja descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização suspensa ou revogada pelo IEF e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação em vigor;
10. O responsável poderá, durante a validade desta autorização e mediante Termo de Compromisso firmado, solicitar à Assessoria de Programas e Projetos Especiais do IEF Renovação, Cancelamento ou Correção, conforme indicações no site do IEF (<http://www.ief.mg.gov.br/biodiversidade/pesquisas-cientificas/>);
11. Esta autorização é válida somente para atividades realizadas exclusivamente no estado de Minas Gerais;
12. O pesquisador deverá estar sempre acompanhado desta autorização pois apresenta-se às autoridades, quando solicitada.

#### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Portaria 239/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de subproduto não contemplado na autorização deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada ao IEF e ao responsável da UC, dentro de 30 dias após a atividade de campo, por meio de envio da cópia do registro de coleta imprevista de material biológico. O transporte do material biológico ou de subproduto deverá ser acompanhado da autorização e desta anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica.

Unidade de Conservação	Taxão*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data	Instituição

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Assinatura do responsável pela Autorização  <b>Antônio Augusto Melo Malard</b> Diretor Geral do IEF MSP 1.176-924-6	Número do Processo SIGEP/SIPRO - IEF/ASPIROP
--	--

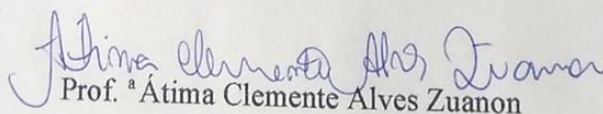
ANEXO B - Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – CEUA/UFV

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 82/2018, intitulado “**Estudo toxicológico do extrato etanólico das folhas de aureliana velutina sendtner (solanaceae) em ratos wistar**”, coordenado pela professora Mariana Machado Neves do Departamento de de Biologia Geral, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 21/03/2019, com validade de 12 meses.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 82/2018, named “**Toxicological study of the ethanolic extract of leaves of aureliana velutina sendtner (solanaceae) in wistar rats**”, is in agreement with the a actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 21, 2019 valid for 12 months.

  
Prof.ª Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV