

**EDUARDO MEDEIROS DAMASCENO**

**EFEITOS DO EXTRATO ALCOÓLICO DE CIPÓ-CRAVO *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae) SOBRE TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SWISS ADULTOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

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

T

D155e  
2017 Damasceno, Eduardo Medeiros, 1978-  
Efeitos do extrato alcoólico de cipó-cravo (*Tynanthus fasciculatus* Miers, Bignoniaceae) sobre testículos de camundongos swiss adultos / Eduardo Medeiros Damasceno. – Viçosa, MG, 2017.  
xiii, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. *Tynanthus fasciculatus*. 2. Plantas medicinais.  
3. Histologia. 4. Afrodisiacos. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação  
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 583.95

**EDUARDO MEDEIROS DAMASCENO**

**EFEITOS DO EXTRATO ALCOÓLICO DE CIPÓ-CRAVO *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae) SOBRE TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SWISS ADULTOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 03 de abril de 2017.



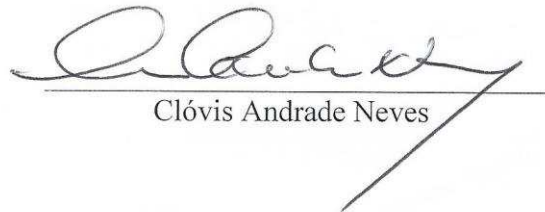
Hélio Chiarini-Garcia



Reggiani Vilela Gonçalves



João Paulo Viana Leite



Clóvis Andrade Neves



Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Juraci Lucas e Lucy (*in memoriam*), que me deram a vida.

À minha madrastra Odete.

Aos meus irmãos Oliver e Ana Maria.

Ao meu orientador Sérgio da Matta

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, responsáveis pela minha existência, pessoas maravilhosas que sempre acreditaram em mim e me apoiaram. Vocês são exemplos de vida para mim!

Aos meus irmãos Ana Maria e Oliver, pelo apoio, amizade e principalmente pelo amor que nos une.

A minha madrastra Odete, por todo apoio, amizade e carinho.

Aos meus amigos que sonharam comigo, Elândia, Felipe Zanelato, Inês, Juliana Borgo, Patrícia Martins, Rodrigo Brito e Tiago dos Santos.

A minha família do Laboratório de Biologia Estrutural, Fernanda, Viviane, Janaina, Lidiane, Felipe, Luiz, Susana, Tatiana, Ana Luiza, Ana Claudia, Veronica, Marli, Talita e Graziela. Valeu demais!

Ao meu brother “Daniels”, por toda ajuda e apoio!

A Jerusa por toda ajuda prestada nas análises de estresse oxidativo. Muito obrigado!

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e à brilhante contribuição na capacitação de novos profissionais.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela seriedade dos seus trabalhos e por ter sido acessível a todas as solicitações no decorrer do curso.

Aos meus alunos do curso de medicina do Unifaminas. Obrigado pela compreensão!

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa fornecida durante o período do doutorado.

Ao meu orientador Sérgio Luis Pinto da Matta, por sempre acreditar em mim e fazer de mim um profissional mais capacitada. Obrigado por nunca “fechar a porta” para quem tem “brilho nos olhos”. Espelhe-me muito em você e serei eternamente grato pelos seus ensinamentos e conhecimentos. Obrigado por tudo!

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

A minha coorientadora Marli do Carmo Cupertino pela amizade e contribuições ao longo deste trabalho.

Aos professores da banca Hélio Chiarini, João Paulo Viana Leite, Clóvis Andrade Neves e Reggiani Vilela Gonçalves, por todas as considerações que certamente contribuirão para a melhoria deste trabalho.

Ao professor João Paulo Viana Leite e seus alunos Antônio Xavier e Leticia, pelo auxílio na preparação do extrato.

Ao professor Antônio José Natali, por disponibilizar o espaço e a estrutura necessária para realização do experimento, no Biotério do Departamento de Educação Física.

Ao laboratório de Sistemática Molecular - Beagle - por ceder espaço e equipamento para a captura das imagens.

A minha amiga de espermatogênese e de coração, pelo apoio incondicional durante o experimento, Fernanda Carolina. Isto é só uma demonstração das parcerias de trabalho e da verdadeira amizade que construímos.

Aos amigos que auxiliaram no tratamento dos animais, Fernanda, Viviane, Wilson, Janaina, Luiz e Lidiane, muito, obrigado!

A secretaria do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Elizabeth, pelo atendimento atencioso e sempre disposta a ajudar.

Ao setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal, UFV, na pessoa do Seu Tião Mateiro, peça fundamental na coleta do material botânico.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	3
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	3
2.1.1 Prospecção fitoquímica .....	3
2.1.2 Testículos .....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
3.1 Fitoterapia .....	4
3.3 Plantas com potencial afrodisíaco .....	6
3.4 Química de plantas afrodisíacas .....	9
3.5 Cipó-cravo - <i>Tynanthus fasciculatus</i> .....	10
3.6 Testículo .....	14
3.7 Espermatogênese .....	16
3.8 Células de Sertoli .....	17
3.9 Células de Leydig .....	19
3.10 Estresse oxidativo .....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 Coleta e processamento do material botânico .....	23
4.2 Prospecção fitoquímica .....	24
4.3 Perfil Cromatográfico do extrato em HPLC .....	25
4.4 Delineamento Experimental .....	25
4.5 Coleta de amostras .....	26
4.6 Microscopia de luz .....	26
4.7 Análises morfométricas dos testículos .....	26
4.7.1 Dados biométricos .....	26
4.7.2 Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo ..	27
4.7.3 Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero .....	27
4.7.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo .....	28
4.7.5 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero .....	28
4.7.6 Razões entre os números celulares .....	29
4.7.7 Número de células de Sertoli por testículo .....	29
4.7.8 Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo .....	30
4.8 Análises qualitativas e quantitativas histopatológicas .....	30
4.9 Análise Morfométrica e estereológica do intertúbulo .....	31
4.9.1 Proporções volumétricas e volume dos componentes intertubulares .....	31
4.9.2 Diâmetro nuclear, volume nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo	31
4.9.3 Índice Leydigossomático .....	32
4.10 Atividade das enzimas antioxidantes e determinação de malondialdeído .....	32
4.10.1 Determinação da Superóxido Dismutase .....	32
4.10.2 Determinação de Catalase .....	33

<b>4.10.3 Determinação do Malondialdeído</b> .....	33
<b>4.12 Análises estatísticas</b> .....	33
<b>5. RESULTADOS</b> .....	34
<b>5.1 Prospecção Fitoquímica</b> .....	34
<b>5.2 Fingerprint I do extrato do caule de <i>T. fasciculatus</i></b> .....	34
<b>5.3 Biometrias corporal e testicular</b> .....	35
<b>5.4 Morfometria Tubular</b> .....	35
<b>5.5 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero</b> .....	37
<b>5.6 Análises quantitativas e qualitativas histopatológicas</b> .....	40
<b>4.5 Morfometria Intertubular</b> .....	43
<b>5.8 Atividade das Enzimas Antioxidantes e Determinação de Malondialdeído (MDA)</b> .....	46
<b>4.7 Testosterona sérica</b> .....	48
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Lista de espécies vegetais estudadas com potencial afrodisíaco.....	7
<b>Tabela 2:</b> Lista das espécies do gênero <i>Tynanthus</i> com indicações do uso tradicional, bem como estudos relatados das atividades biológicas e farmacológicas..	12
<b>Tabela 3:</b> Grupos químicos e substâncias isoladas das espécies do gênero <i>Tynanthus</i> .....	13
<b>Tabela 4:</b> Classes de metabólitos secundários investigadas no extrato alcoólico do caule de <i>T. fasciculatus</i> (EATF).....	24
<b>Tabela 5:</b> Prospecção fitoquímica do extrato alcoólico de <i>T. fasciculatus</i> (EATF).....	34
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros biométricos testiculares de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	35
<b>Tabela 7:</b> Índice gonadossomático, índice parenquimossomático, índice tubulossomático e índice epiteliossomático de camundongos Swiss a diferentes concentrações de EATF. ....	36
<b>Tabela 8:</b> Proporção volumétrica dos componentes tubulares de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF. ....	36
<b>Tabela 9:</b> Volume dos componentes tubulares por testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF. ....	37
<b>Tabela 10:</b> Altura de epitélio seminífero, diâmetro tubular, comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	37
<b>Tabela 11:</b> Números corrigidos de células de linhagem espermatogênica de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	38
<b>Tabela 12:</b> Proporção volumétrica (IT) e volume (VIT) de intertúbulo e índice Leydigossomático (ILS) de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF..	43
<b>Tabela 13:</b> Proporção volumétrica dos componentes intertubulares de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	44
<b>Tabela 14:</b> Volume dos componentes intertubulares de testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	44

**Tabela 15:** Diâmetro nuclear de Leydig (DN), volume nuclear de Leydig (VNL), volume citoplasmático de Leydig (VCL) e volume da célula de Leydig (VL) de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF..... 45

**Tabela 16:** Volume de células de Leydig por testículo (VLT) e por grama de testículo (VL/gT), número de células de Leydig por testículo (NL) e por grama de testículo (NL/gT) de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF. .... 45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Caule do cipó-cravo <i>Tynanthus fasciculatus</i> .....	24
<b>Figura 2:</b> Cromatograma do extrato alcoólico do caule do cipó-cravo <i>T. fasciculatus</i> .. .....	35
<b>Figura 3:</b> Produção espermática diária em testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	38
<b>Figura 4:</b> Rendimento geral da espermatogênese, índices mitótico e meiótico do epitélio seminífero de testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF... .....	39
<b>Figura 5:</b> Morfometria da célula de Sertoli em testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF .....	40
<b>Figura 6:</b> Fotomicrografias de testículos de camundongos Swiss.. .....	41
<b>Figura 7:</b> Fotomicrografias de testículos de camundongos tratados com EATF 300mg/kg de peso corporal. ....	42
<b>Figura 8:</b> Proporção de túbulos seminíferos normais e patológicos de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	43
<b>Figura 9:</b> Fotomicrografias da região intertubular de testículos de camundongos Swiss. ....	46
<b>Figura 10:</b> Atividade das enzimas antioxidantes e determinação do malondialdeído em testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	47
<b>Figura 11:</b> Concentração de testosterona sérica camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.....	48

## RESUMO

DAMASCENO, Eduardo Medeiros, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2017. **Efeitos do extrato alcoólico de cipó-cravo *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae) sobre testículos de camundongos Swiss adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

O uso indiscriminado de drogas vegetais ou alopáticas com finalidades afrodisíacas é extremamente temerário, visto que muitas delas apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes em suas preparações. *Tynanthus fasciculatus* é uma espécie utilizada popularmente para diversos fins terapêuticos, contra indigestão, dores de estômago, diarreia, controle de vermes e também como afrodisíaco. O presente trabalho aborda aspectos da reprodução animal, com enfoque na histomorfometria testicular, respostas antioxidantes dos testículos, níveis séricos de testosterona e os eventos que ocorrem na espermatogênese sob influência do extrato alcoólico obtido da espécie vegetal *T. fasciculatus*. Foram utilizados 40 animais distribuídos em quatro grupos (n=10): grupo 1 (G1) controle; grupos 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) receberam 100, 200 e 300mg de EATF por kg de peso corporal e tratados por 42 dias consecutivos via gavagem. O extrato de *T. fasciculatus* foi submetido à prospecção fitoquímica e revelou a presença de flavonoides, taninos, triterpenos/esteroides, cumarinas e saponinas. Houve aumento do peso testicular e dos índices gonadossomático, parenquimossomático, tubulossomático e epiteliossomático, assim como nos volúmens de túbulo, epitélio e túnica própria nos grupos EATF100 e EATF200. Nestes grupos também aumentaram o comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e a produção espermática diária. Foi observada redução na capacidade de suporte total de células de Sertoli nos grupos EATF200 e EATF300. Houve aumento nos números corrigidos de espermátocitos primários em preleptóteno/leptóteno e paquíteno, e, proporção volumétrica de célula Leydig no EATF100, ao passo que, espermátide arredondada e os níveis séricos de testosterona aumentaram no EATF100 e 200. Por outro lado, o EATF300 apresentou alterações patológicas na região tubular e peroxidação lipídica, marcada pelo aumento de malondialdeído. Pode-se inferir que o EATF100 e EATF200 promoveram aumento significativo no peso testicular e nos parâmetros tubulares, especialmente aqueles relacionados ao epitélio seminífero, sem comprometimento da

espermatogênese. Contudo, o tratamento com EATF300, apresentou alterações no microambiente, evidenciadas pelas alterações patológicas tubulares e aumento de MDA. Diante disso, podemos concluir que as dosagens menores do EATF são mais seguras e eficazes para os parâmetros morfológicos e/ou morfométricos, principalmente sobre o parênquima testicular.

## ABSTRACT

DAMASCENO, Eduardo Medeiros, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2017. **Effects of alcoholic extract of clove vine *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae) on tests of adult Swiss mice.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

The indiscriminate use of vegetable or allopathic drugs for aphrodisiac purposes is extremely reckless, since many of them present substances that can trigger adverse reactions, either by its own components or by the presence of contaminants or adulterants present in its preparations. *Tynanthus fasciculatus* is a species used popularly for various therapeutic purposes, such as indigestion, stomach pains, diarrhea, control of worms and also as an aphrodisiac. The present work deals with aspects of animal reproduction, focusing on testicular histomorphometry, antioxidant responses of the testis, serum testosterone levels and the events that occur in spermatogenesis under the influence of the alcoholic extract obtained from the plant species *T. fasciculatus*. Forty animals were distributed into four groups (n = 10): group 1 (G1) control; Groups 2 (G2), 3 (G3) and 4 (G4) received 100, 200 and 300 mg of EATF per kg of body weight and treated for 42 consecutive days via gavage. The extract of *T. fasciculatus* was submitted to phytochemical prospection and revealed the presence of flavonoids, tannins, triterpenes/steroids, coumarins and saponins. There was an increase in testicular weight and the gonadosomatic, parenchymosomatic, tubulesomatic and epitheliosomatic indices, as well as in the tubule, epithelium and tunica propria volumes in the EATF100 and EATF200 groups. In these groups also increased the total length of the seminiferous tubules by testis and the daily sperm production. Reduction in the total support capacity of Sertoli cells in the EATF200 and EATF300 groups was observed. There was an increase in the corrected numbers of primary spermatocytes in preleptotene/leptotene and pachytene, and the Leydig cell volumetric ratio in EATF100, while, rounded spermatid and serum testosterone levels increased in EATF100 and 200. EATF300 presented pathological alterations in the tubular region and lipid peroxidation, marked by the increase of malondialdehyde. The results obtained allow us to infer that EATF100 and EATF200 promoted a significant increase in testicular weight and tubular parameters, especially those related to the seminiferous epithelium, without compromising spermatogenesis. However, treatment with EATF300 presented alterations in the microenvironment, evidenced by tubular pathological alterations

and increased MDA. Therefore, we can conclude that the lower dosages of EATF are safer and more effective for morphological and / or morphometric parameters, especially on the testicular parenchyma.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas medicinais como afrodisíacos para melhorar o desempenho sexual é uma prática antiga e geralmente vista como uma solução rápida e de fácil acesso. O uso indiscriminado de drogas vegetais ou alopáticas com finalidades afrodisíacas é extremamente temerário, visto que muitas delas apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes em suas preparações. Apesar disso, as experimentações científicas e testes monitorados associados à reprodução para investigar efeitos tóxicos ou validar sua aplicabilidade são poucos, se comparado à larga utilização popular (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). É possível que uma planta medicinal funcione como estimulante sexual e ao mesmo tempo interfira de forma negativa em parâmetros testiculares por alterar a integridade de seus elementos. Desta forma, inicialmente a produção espermática pode ser reduzida e em longo prazo, causar alterações irreversíveis que podem levar à infertilidade.

Algumas plantas utilizadas popularmente como afrodisíacas agem aumentando a produção espermática e trazem benefícios para os parâmetros testiculares, como comprovado em *Fadogia agrestis* (YAKUBU et al., 2005; MALVIYA et al., 2011) e *Lepidium meyenii* (ZHENG et al, 2000; CICERO et al., 2001; CICERO et al, 2002). Deve-se considerar ainda que a real atuação de uma planta medicinal supostamente relacionada a constituintes afrodisíacos e com ação sobre o comportamento e desempenho sexual humano pode ser simplesmente uma manifestação do efeito placebo. Isto reforça a importância dos estudos reprodutivos em espécies já amplamente utilizadas, especialmente sobre os efeitos em parâmetros testiculares.

O testículo é um órgão produtor de espermatozoides e andrógenos, sendo dividido funcionalmente em dois compartimentos: o tubular ou spermatogênico e o intertubular ou androgênico. No epitélio seminífero do túbulo ocorre o processo de spermatogênese, sob a regência da célula de Sertoli. O compartimento intertubular é formado pelas células de Leydig, produtoras de testosterona, por células do conjuntivo (macrófagos e fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos (RUSSELL et al., 1990a). A avaliação da integridade desses dois compartimentos, após administração de determinada substância, é capaz de fornecer respostas sobre a ação

positiva ou negativa da mesma no processo espermatogênico e no funcionamento das células de Leydig.

A testosterona é um andrógeno essencial para manter a espermatogênese em vários níveis. Por exemplo, na ausência de testosterona ou do receptor de andrógeno (AR), a formação da barreira hematotesticular (barreira da célula de Sertoli) é comprometida, as células germinativas são incapazes de progredir na meiose, as células germinativas imaturas são prematuramente deslocadas das células de Sertoli e espermatozoides maduros não são liberados das células de Sertoli. A interrupção de qualquer uma destas etapas dependentes de testosterona resulta na falha da espermatogênese que pode levar à infertilidade (WALKER; CHENG, 2005). A espermatogênese é um processo replicativo extremamente ativo e as elevadas taxas de divisão celular inerentes a este processo implicam correspondentes taxas elevadas de consumo de oxigênio mitocondrial pelo epitélio seminífero. Por esta razão, os testículos contêm um elaborado conjunto de enzimas antioxidantes para garantir que as funções espermatogênicas e esteroidogênicas desse órgão não sejam afetadas pelo estresse oxidativo (AITKEN; ROMAN, 2008). Estes sistemas de defesa antioxidante são de grande importância, pois a exposição xenobiótica promove danos oxidativos que culminam em alterações patológicas (MRUK et al., 2002).

Dentre as várias plantas utilizadas na medicina popular, a espécie *Tynanthus fasciculatus*, popularmente conhecida como cipó cravo, destaca-se devido seu uso no combate à indigestão, dores de estômago, tratamento de diarreia e controle de vermes. Essa espécie vegetal é utilizada ainda como afrodisíaco em preparações alcoólicas, onde partes do caule são colocadas dentro de aguardente de cana. Contudo, esses preparados são utilizados sem embasamento científico, expondo os usuários a diferentes concentrações. Apesar de bastante utilizada pela população, há poucos estudos relacionando seu uso à espermatogênese. Assim, o presente trabalho aborda aspectos da reprodução animal, com enfoque na histomorfometria testicular, respostas antioxidantes dos testículos, níveis séricos de testosterona e os eventos que ocorrem na espermatogênese sob influência do extrato alcoólico obtido da espécie vegetal *Tynanthus fasciculatus*.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de doses crescentes do extrato alcoólico do caule de *Tynanthus fasciculatus* nos testículos de camundongos adultos, através de investigações morfológicas, histométricas e enzimáticas gonadais.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.1.1 Prospecção fitoquímica

- ✓ Realizar a prospecção fitoquímica e cromatográfica do extrato alcoólico do caule de *T. fasciculatus*.

#### 2.1.2 Testículos

- ✓ Determinar a proporção volumétrica e volume dos componentes dos túbulos seminíferos e intertúbulo e das células em estágio I do ciclo do epitélio seminífero;
- ✓ Calcular os índices, gonadossomático (IGS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES), parenquimossomático (IPS), mitótico (IMI), meiótico (IME), Leydigossomático (ILS) e da célula de Sertoli (ICS);
- ✓ Mensurar a altura do epitélio seminífero e o diâmetro dos túbulos seminíferos;
- ✓ Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos e a produção espermática diária total por testículo e por grama de testículo;
- ✓ Avaliar parâmetros morfométricos das células de Sertoli e células de Leydig;
- ✓ Mensurar atividade de enzimas antioxidantes e determinação de malondialdeído;
- ✓ Determinar a concentração de testosterona sérica.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Fitoterapia

O uso de plantas medicinais é uma prática tão antiga quanto a espécie humana e, em muitas situações, trata-se do único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002). Num sentido mais amplo, as plantas medicinais podem ser definidas como todos os vegetais que têm emprego com fins terapêuticos, alicerçados no conhecimento popular ou no conhecimento científico (YUNES et al., 2001). Assim, os produtos naturais desempenham papel importante no campo da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. Embora seja uma prática antiga, somente a partir do século XIX o homem começou a isolar os princípios ativos de plantas medicinais e o marco desse momento se deu pelos cientistas franceses, Caventou e Pelletier, que isolaram da casca de Cinchona, o quinino (KONG et al., 2003).

Antes da Segunda Guerra Mundial, uma série de produtos naturais foi isolada de plantas e essas substâncias ainda são utilizadas atualmente, tais como, o quinino, da casca de Cinchona, morfina e codeína isoladas a partir do látex da papoula, digoxina isolada de folhas de *Digitalis lanata* e atropina derivada de espécies da família Solanaceae (KONG et al., 2003). Alguns antibióticos produzidos durante e após a Segunda Guerra Mundial continuam ainda sendo utilizados. Estes antibióticos foram desenvolvidos a partir de espécies de fungos *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces*. Nos anos de pós-guerra, houve descobertas de novos fármacos isolados de plantas, como a reserpina, isolada da *Rauwolfia* e a vimblastina isolada de *Catharanthus roseus* (KONG et al., 2003).

Pesquisas com plantas medicinais têm incentivo da Organização Mundial da Saúde (OMS), mediante as resoluções WHA 31.33 (1978) e 40.33 (1987), onde reafirmam a importância de espécies vegetais nos cuidados com a saúde. São recomendados, entre outros aspectos, a criação de programas globais para a identificação, validação, preparação, cultivo e conservação dessas espécies utilizadas na medicina tradicional, bem como assegurar o controle de qualidade dos fitoterápicos (OLIVEIRA et al., 2006). A fitoterapia (do grego *phyton* = vegetal e *therapeia* = tratamento) é o tratamento ou a prevenção de doenças usando preparações ou substâncias de origem vegetal. De acordo com a legislação sanitária

brasileira, fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais (CARVALHO et al., 2009). As etapas de desenvolvimento de fitoterápicos envolvem diversas áreas do conhecimento, como a etnobotânica, botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia e tecnologia farmacêutica (TOLEDO et al., 2003). Conforme Leite (2009), levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações científicas e ensaios clínicos, validam sua eficácia e segurança. Esses conhecimentos são fontes de informações preliminares de eficácia ou toxicidade das plantas medicinais, inspirando estudos científicos sobre essas propriedades terapêuticas e contribuindo enormemente para o surgimento de medicamentos inovadores, hoje comercializados em todo o mundo, para o tratamento de inúmeras enfermidades (PATEL et al., 2011).

A utilização de fitoterápicos no Brasil obteve sua oficialização através da Farmacopeia Brasileira em 1929. Em meados da década de 90, o uso de fitoterápico passou a ser normatizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (Portaria 06/95 ANVISA), definindo-o como “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se, exclusivamente, matérias primas ativas vegetais com a finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário”. O registro de fitoterápicos baseado em seu uso tradicional passou a ser permitido pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 13 de maio de 2014. Essa RDC define o uso tradicional como aquele alicerçado no longo histórico de utilização no ser humano demonstrado em documentação técnico-científica, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário.

### **3.2 Estimulação Sexual – Afrodisíacos**

Segundo levantamento da OMS, uma boa parcela da população mundial depende de medicamentos de origem vegetal em seus cuidados primários de saúde. O aumento da popularidade do uso de ervas medicinais trouxe a atenção para o uso mais seguro de plantas que são utilizados com frequência (ALOK et al., 2013).

A palavra afrodisíaco é de origem grega (aphrodisiakós), sendo derivada de "Aphrodite" a deusa grega do amor. Um afrodisíaco inclui qualquer alimento ou droga que desperta o instinto sexual, induz o desejo venéreo, aumenta o prazer e o desempenho sexual. Existem dois tipos principais de afrodisíacos: estímulos

psicofisiológicos (visual, tátil, olfatório e fonético) e preparações internas (alimentos, bebidas alcoólicas e poções de amor) (MALVIYA et al., 2011; SINGH et al., 2013). Conforme Shamloul (2010) e Melnyk e Marcone (2011), essa definição foi ampliada para incluir as substâncias que melhoram o desempenho sexual ou ajudam no bom funcionamento dos órgãos sexuais femininos e masculinos. Ao longo da história a sociedade tem demonstrado confiança nos afrodisíacos. Nas culturas chinesa, indiana, egípcia, romana e grega, tais substâncias foram utilizadas com o propósito de melhorar o desempenho sexual (ELFERINK, 2000). Em culturas milenares, a procriação era o objetivo mais importante e, por esta razão, a incapacidade de procriar impulsionou esforços para descobrir fontes naturais e substâncias para melhorar o desempenho sexual (PARK et al., 2007). Os afrodisíacos eram utilizados por casais com problemas de fertilidade e também por casais com uma vida sexual insatisfatória (YAKUBU et al., 2007). Na cultura Asteca, por exemplo, uma família grande era respeitada e admirada dentro da sociedade e um casamento sem filhos era considerado um fracasso e, por essas razões, os afrodisíacos sempre foram altamente procurados e valorizados (ELFERINK, 2000).

Os afrodisíacos podem atuar alterando o nível hormonal, agindo sobre as células de Leydig e/ou alterando o nível de transmissores específicos da fisiologia peniana, ou ainda agindo no relaxamento do músculo liso, aumentando o fluxo sanguíneo e permitindo a vasodilatação dos corpos cavernosos, facilitando assim a ereção peniana (SANDRONI, 2001; CHATURAPANICH et al., 2008; ZAMBLÉ et al., 2008; MALVIYA et al., 2011; SINGH et al., 2013). Porém, segundo Patel et al. (2011) e Alok et al. (2013), a maioria dos agentes afrodisíacos age alterando a concentração de testosterona no corpo.

### **3.3 Plantas com potencial afrodisíaco**

Diversas plantas medicinais foram identificadas ou avaliadas quanto ao seu potencial afrodisíaco (ALOK et al., 2013) e várias delas demonstraram possuir agentes afrodisíacos atuando no aumento da libido e melhorando o desempenho sexual, comprovados através de ensaios experimentais (SINGH et al., 2013).

Nesse sentido, vários estudos foram realizados com plantas medicinais com poder estimulante (Tabela 1).

**Tabela 1.** Lista de espécies vegetais estudadas com potencial afrodisíaco.

<b>Nome da planta</b>	<b>Família</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Extrato utilizado</b>	<b>Benefícios</b>	<b>Referência</b>
<i>Ruta chalepensis</i>	Rutaceae	Folha	Aquoso	Aumento de peso testicular; Aumento de níveis séricos de testosterona; Aumento de contagem espermática.	QARAWI, 2005
<i>Fadogia agrestis</i>	Rubiaceae	Caule	Aquoso	Aumento de níveis séricos de testosterona; Melhoria de desempenho sexual com aumento no número de montagem e frequência de intromissão.	YAKUBU et al., 2005
<i>Kaempferia parviflora</i>	Zingiberaceae	Rizomas	Etanólico	Aumento do fluxo sanguíneo testicular	CHATURAPANICH et al., 2008
<i>Blepharis edulis</i>	Acanthaceae	Semente	Etanólico	Aumento nos níveis séricos de testosterona; Melhoria de desempenho sexual, frequência de montagem, latência de intromissão.	PANDE; PATHAK, 2009
<i>Tynanthus fasciculatus</i>	Bignoniaceae	Caule	Aquoso	Aumento de parênquima testicular; Aumento de volume e comprimento total dos túbulos seminíferos; Aumento de produção espermática diária.	MELO et al., 2010
<i>Asteracanta longifolia</i>	Acanthaceae	Semente	Etanólico	Aumento de peso testicular; Melhoria de desempenho sexual, frequência de montagem, latência de intromissão, latência de montagem; Aumento da espermatogênese.	CHAUHAN et al., 2011
<i>Asparagus racemosus</i>	Liliaceae	Raiz	Hidroalcoólico	Melhoria de desempenho sexual	WANI et al., 2011

				com aumento no número de montagem	
<i>Tribulus terrestris</i>	Zygophyllaceae	Fruto	-	Aumento de peso testicular; Melhoria de desempenho sexual com aumento de frequência de montagem;	SINGH;GUPTA, 2011
<i>Paederia foetida</i>	Rubiaceae	Folha	Etanólico	Aumento de peso testicular; Aumento de peso de epidídimo, próstata, vesícula seminal; Aumento de níveis séricos de testosterona.	SONI et al., 2012
<i>Carthamus tinctorius</i>	Asteraceae	Flor	Aquoso	Aumento de motilidade espermática; Aumento de níveis séricos de testosterona; Aumento de peso testicular.	BAHMANPOUR, et al., 2012
<i>Landolphia dulcis</i>	Apocynaceae	Raiz	Etanólico	Melhoria de desempenho sexual com aumento de frequência de montagem e frequência de intromissão; Aumento de níveis séricos de testosterona.	ILODIGWE et al., 2013
<i>Monsonia angustifolia</i>	Geraniaceae	Parte aérea	Aquoso	Melhoria de desempenho sexual com aumento de frequência de montagem, frequência de intromissão, latência de ejaculação; Aumento de níveis séricos de testosterona.	FOUCHE et al., 2015

O uso indiscriminado de plantas com potencial afrodisíaco é extremamente perigoso devido à falta informações satisfatórias sobre seus mecanismos de ação e, principalmente, sobre seus efeitos sobre a espermatogênese e esteroidogênese, na maioria das vezes desconhecidos.

### **3.4 Química de plantas afrodisíacas**

O Brasil é um país com cerca de 50.000 espécies de plantas superiores, e detentor de cerca de um quarto de toda a biodiversidade conhecida no mundo (VELOZO et al., 2002). Muitas destas plantas são usadas na medicina popular para fins afrodisíacos na forma de chás ou misturadas com álcool.

Os flavonoides são polifenóis encontrados naturalmente nas plantas. São responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, porém estão presentes em todas as partes da planta. Já foram identificados mais de 8000 flavonoides que surgem da ampla variação de combinações de grupos metil e hidroxil (VOLP et al., 2008). Possuem potencial terapêutico e diversas propriedades biológicas como: antioxidantes (YUTING et al., 1990), anti-inflamatórias (FERRÁNDIZ; ALCARAZ, 1991), antimutagênicas (EDENHARDER et al., 1993) e antiespasmódicas (DUARTE et al., 1993) e anticancerígenas (MENON et al., 1995).

Estudos conduzidos por Ko et al. (2004) estabeleceram relação entre a estrutura de alguns flavonoides e seus efeitos inibitórios sobre fosfodiesterases (PDE), dentre as quais a PDE-5. Esta enzima promove a degradação da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), uma molécula de segundo mensageiro que forma a conexão seguinte na cadeia de sinalização do óxido nítrico (NO) que leva à resposta celular final. O GMPc, em especial, relaxa as artérias do pênis e as malhas trabeculares das fibras musculares lisas no tecido erétil dos corpos cavernosos e corpo esponjoso peniano. O estudo conduzidos por esses autores, afirma que a luteolina apresentou maior atividade entre os flavonoides investigados, comprovando a importância de uma ligação dupla entre C-2 e C-3 para a inibição de PDE-5. Assim, é possível sintetizar drogas úteis a partir de alterações feitas na estrutura de flavonoides, permitindo assim, a inibição seletiva da PDE-5 (KO et al., 2004).

As saponinas são compostos sem nitrogênio, em geral glicosídeos de esteroides ou terpenos policíclicos, amplamente distribuídos em plantas superiores. As saponinas possuem grande variedade de atividades biológicas, incluindo hemolítica,

hepatoprotetora, antimutagênica, antiviral, leishmanicida e anti-inflamatória (SILVA et al., 2012). Alguns estudos sugerem que determinados constituintes químicos presentes em plantas afrodisíacas mimetizam hormônios, como por exemplo, as saponinas e outros constituintes triterpênicos com estrutura muito similar à de hormônios esteroides (MENDES, 2011). A protodioscina, uma saponina esteroidal presente no *Tribulus terrestris*, teve clinicamente comprovada sua atividade de melhorar o desejo sexual e a ereção através da sua conversão em deidroepiandrosterona (DHEA), precursor da testosterona (ADIMOELJA, 2000). A *Discoreae villosa*, conhecida como inhame selvagem, possui na sua composição química saponinas esteroidais, principalmente pertencentes às classes espirostanol e furostanol, muito presentes nas espécies do gênero *Discoreae*, servindo como importantes marcadores químicos para o controle de qualidade de produtos à base destas plantas (DONG et al., 2013). A diosgenina, obtida após hidrólise de saponinas do inhame selvagem, é utilizada como material de partida para a síntese industrial parcial de fármacos esteroidais, como progesterona e testosterona (HU et al., 2007).

A investigação das classes de metabólitos presentes nas plantas pode auxiliar na avaliação da relação entre a estrutura e possível atividade das substâncias afrodisíacas, o que pode contribuir para o desenvolvimento e produção de novas drogas eficazes e seguras derivadas de produtos naturais.

### **3.5 Cipó-cravo - *Tynanthus fasciculatus***

Bignoniaceae é uma família que reúne 82 gêneros e 827 espécies (LOHMANN; ULLOA, 2007) e possui ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo. É frequente nos trópicos americanos (JOLY, 1985) e geralmente espontânea na América do Sul. Podem ser encontradas na forma de árvores, lianas, arbustos e raramente ervas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

O gênero *Tynanthus* foi originalmente descrito por Miers (1863) e o tratamento taxonômico mais compreensivo para o gênero foi realizado por Bureau (1868). A palavra *Tynanthus* deriva do grego: *tynnos* = pequeno; *anthos* = flor, em referência às suas flores muito pequenas (SANDWITH; HUNT, 1974). De acordo com o Royal Botanic Gardens (“IPLANTS”, 2016) são reconhecidas e registradas as seguintes espécies neste gênero: *T. sastrei*, *T. schumannianus*, *T. macranthus*, *T. micranthus*,

*T. labiatus*, *T. espiritosantensis*, *T. gondotianus*, *T. guatemalensis*, *T. cognatus*, *T. croatianus*, *T. densiflorus* e *T. fasciculatus*.

Conforme Lohmann e Ulloa (2007), as espécies do gênero *Tynanthus* estão amplamente distribuídas pela América tropical, principalmente em florestas úmidas, estando presentes desde o México até o sul do Brasil. As espécies pertencentes a este gênero são lianas conhecidas popularmente como cipó-cravo, devido ao forte odor semelhante ao cravo-da-índia que exala dos caules e folhas quando cortados ou macerados, e são usadas na medicina popular para os mais diversos fins terapêuticos (GENTRY, 1992). Na medicina popular, as espécies de *Tynanthus* são utilizadas para diversos fins (Tabela 2) e em função dessa ampla utilização vários estudos fitoquímicos têm sido realizados (Tabela 3).

**Tabela 2.** Lista das espécies do gênero *Tynanthus* com indicações do uso tradicional, bem como os estudos relatados das atividades biológicas e farmacológicas.

<b>Espécie</b>	<b>Uso tradicional</b>	<b>Atividades biológicas e farmacológicas estudadas</b>	<b>Referências</b>
<i>T. guatemalensis</i>	Diabetes	Atividade antimicrobiana e diabetes	MIRANDA-CRUZ et al., 2012; FERRIER et al., 2013;
<i>T. micranthus</i>	Afrodisíaco	Atividade antimicrobiana, alelopática, antioxidantes e afrodisíaca	CUSTÓDIO et al., 2010; CANSIAN et al., 2012; CANSIAN, et al., 2013; CANSIAN et al., 2014a; CANSIAN et al., 2014b
<i>T. panurensis</i>	Afrodisíaco, analgésico, tratamento de reumatismo e diabetes	Atividade antioxidante e anti-inflamatória	BRACK, 1999; MORALES et al., 2011
<i>T. schumannianus</i>	Antidiarreico	Atividade antimalárica	QUINTANA; VARGAS, 1995; MUÑOZ et al., 2000
<i>T. fasciculatus</i>	Carminativo, anti-helmíntico e afrodisíaco	Morfometria de órgãos reprodutivos masculinos e atividade anti-helmíntica	FARMACOPEIA, 1929; CORREA, 1974; VILEGAS, 1993; AMORIM et al., 1991; MELO et al., 2010;

**Tabela 3.** Grupos químicos e substâncias isoladas das espécies do gênero *Tynanthus*.

<b>Espécie</b>	<b>Grupos químicos</b>	<b>Substâncias isoladas</b>	<b>Referências</b>
<i>T. panurensis</i>	Fenilpropanoide glicosídeo e flavonoide	Eugenol-O- $[\beta]$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 5)-O- $\beta$ -Dapiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, verbascosídeo, leucosceptosídeo, isoverbascosídeo e catchimosídeo (apigenina 8-C- $[\beta]$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo)	PLAZA et al., 2005
<i>T. micranthus</i>	Flavonoides (dihidroflavonoides e leucoantocianinas), esteroides e/ou triterpenos, antraquinonas heterosídeos, eugenol	$\beta$ -sitosterol, apigenina	CUSTÓDIO et al., 2010 CANSIAN et al., 2012;
<i>T. guatemalensis</i>	Saponinas, antocianinas e flavonoides, ácido benzoico e derivados, C-glicosil flavonoides e fenilpropanos	4-hidroxibenzoato, ácido salicílico e eugenol	MIRANDA-CRUZ et al., 2012; FERRIER, 2014
<i>T. fasciculatus</i>	Taninos, flavonoides e heterosídeos cardiotônicos, cumarinas, fenilpropanos e esteroides	$\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glicosídeo, cumarina, estigmasterol, éster etílico do ácido meliótico, ácido meliótico, ácido meliótico - O- $\beta$ - D- glicopiranosídeo (melilotosídeo)	VILEGAS, 1993; VILEGAS et al., 1994 CARVALHO et al., 2009;

A espécie *T. fasciculatus*, conhecida popularmente como cipó-cravo, apresenta distribuição restrita ocorrendo no Sudeste do Brasil, em Minas Gerais e São Paulo (“IPLANTS”, 2016). *T. fasciculatus* foi descrita em 1929 pela Farmacopeia Brasileira, como uma planta com ação carminativa e Correa (1974), relatou o uso dessa planta pela população como afrodisíaco. É utilizada na medicina popular como afrodisíaco e estimulante sexual em preparações alcoólicas, sendo também empregada para o combate à indigestão e dores de estômago, tratamento de diarreia e controle de vermes.

Estudos realizados por Melo et al. (2010) demonstraram a ação do extrato aquoso de *T. fasciculatus* nas dosagens de 100mg/kg e 200mg/kg sobre parâmetros morfométricos testiculares. Estes autores verificaram aumento de parênquima testicular, aumento de volume e comprimento total dos túbulos seminíferos e aumento de produção espermática diária. Os resultados obtidos demonstraram o potencial afrodisíaco da espécie vegetal.

### **3.6 Testículo**

O testículo é o órgão responsável pela espermatogênese e síntese de hormônios sexuais. Estes processos asseguram a fertilidade, o desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas. O testículo é geralmente localizado no escroto, coberto parcialmente pela túnica vaginal, uma membrana serosa derivada do peritônio que se forma durante a descida gonadal. Internamente à túnica vaginal há uma cápsula fibrosa branca, composta de tecido conjuntivo denso não modelado, a albugínea testicular. De modo variado nas diferentes espécies de mamíferos, esta túnica emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos (RUSSELL et al., 1990a). As células germinativas formam os espermatozoides no processo espermatogênico, enquanto as células somáticas dão o suporte para a espermatogênese (RUSSELL; FRANÇA, 1995).

Nos mamíferos, o testículo é dividido em dois compartimentos: o intertubular ou intersticial, e o tubular, constituído de túbulos seminíferos (RUSSELL et al., 1990a). Os túbulos seminíferos constituem a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Eles formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas

duas extremidades conectadas à rede testicular, a qual se localiza no mediastino testicular. A partir desta região, a rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes.

Os túbulos seminíferos são desprovidos de vascularização ou inervação, sendo constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. A túnica própria envolve o túbulo externamente, sendo composta de células mioídes e elementos acelulares, como fibras colágenas e a membrana basal. As células mioídes são contráteis com características de células musculares lisas, sendo responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozoides através do lúmen tubular. No epitélio seminífero são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli (RUSSELL et al., 1990a). As células mioídes, juntamente com as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para ela e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero.

As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (preleptótenos), e o adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta maneira, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e protegido do sistema imune, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (SETCHELL, 1991; POCCIA, 1994). Um terceiro ambiente é criado transitoriamente quando ocorre a mudança do preleptóteno do ambiente basal para o adluminal. A célula geralmente encontrada nesse local transitório é o espermatócito primário, na fase de leptóteno (RUSSELL et al., 1990a).

No intertúbulo encontram-se células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos e macrófagos (SETCHELL, 1991). A célula de Leydig, cuja função é a produção de testosterona, é o elemento mais abundante no compartimento intertubular (GODINHO, 1999). Em ratos e camundongos o intertúbulo apresenta um padrão em que as células de Leydig estão associadas a vasos sanguíneos e rodeadas pelo fluido linfático (FAWCETT et al., 1973).

### 3.7. Espermatogênese

Os espermatozoides são produzidos dentro dos túbulos seminíferos, a unidade funcional do testículo, por um processo chamado espermatogênese. Esse processo é dividido em três fases baseado em considerações funcionais: 1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias sofrem sucessivas divisões mitóticas; 2) fase meiótica ou espermatocitogênica, quando o material genético é recombinado e segregado e cada espermatócito dá origem a 4 espermátides; e 3) fase de diferenciação ou espermiogênica, em que espermátides se transformam em células especializadas, os espermatozoides (RUSSELL et al., 1990a; SHARPE, 1994). Esse processo está sob a regulação de gonadotrofinas como hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), androgênios como testosterona e outras biomoléculas (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; WALKER; CHENG, 2005; SMITH; WALKER, 2014).

O processo de produção dos espermatozoides começa com as espermatogônias, situadas próximas à lâmina basal do epitélio germinativo. Trata-se de um evento sincrônico que dura cerca de 40 a 60 dias nos mamíferos estudados, no qual uma espermatogônia (célula diploide), após divisões sucessivas, se diferencia em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide (FRANÇA et al., 1998; GODINHO, 1999).

As células de Sertoli sustentam morfofisiologicamente as quatro camadas distintas de células germinativas que compõem o epitélio seminífero. No ambiente basal do epitélio seminífero encontram-se as espermatogônias e os espermatócitos primários iniciais, enquanto as gerações de espermatócitos primários mais desenvolvidos, espermatócitos secundários e espermátides encontram-se no ambiente adluminal (RUSSELL et al., 1990a). As espermatogônias se dividem por mitose e as células neoformadas podem continuar a se dividir e originar novas espermatogônias ou parar a divisão e crescer, originando os espermatócitos I, células que entram em meiose. Como a prófase da primeira divisão meiótica é muito demorada, a maioria dos espermatócitos I vistos nas preparações histológicas está nessa fase. Os espermatócitos I são as maiores células da linhagem espermatogênica e são caracterizados pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Dessa primeira divisão meiótica resultam células menores, os espermatócitos II, que ficam mais próximas da luz dos túbulos seminíferos sendo difícil observá-los nos

cortes histológicos, pois entram rapidamente na segunda divisão meiótica. Desta divisão resultam as espermátides, caracterizadas pelo pequeno tamanho, núcleos com zona de cromatina condensada e por sua localização quase na luz dos túbulos seminíferos. Nesta fase terminam as divisões celulares da espermatogênese e cada espermátide passará por um processo de modificações complexas, denominadas espermiogênese, que levará à formação dos espermatozoides (HERMO et al., 2010).

O ciclo do epitélio seminífero é formado pelas células espermatogênicas que se encontram organizadas em associações celulares distintas denominadas de estádios, os quais se sucedem com o tempo e de maneira bastante ordenada (HERMO et al., 2010). Existem dois métodos de classificação dos estádios: o da morfologia tubular, no qual são descritos oito estádios do ciclo para todas as espécies, exceto para primatas, (BERNDTSON, 1977; FRANÇA et al., 1998) e o método do sistema acrossômico, no qual o número de estádios é espécie dependente (LEBLOND; CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990a). Em mamíferos, para que o processo espermatogênico se complete, geralmente são necessários em torno de 4,5 ciclos, que corresponde desde a espermatogônia do tipo A1 até a liberação dos espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero (AMANN; SCHANBACHER, 1983; FRANÇA et al., 1998).

### **3.8. Células de Sertoli**

As células de Sertoli estendem-se desde a base até o lúmen dos túbulos seminíferos (OLIVEIRA; ALVES, 2015). São células somáticas, de aspecto colunar, localizadas entre as células germinativas (RUSSELL et al., 1990a). Estas células providenciam um microambiente e suporte citoarquitetural para o desenvolvimento das células espermatogênicas, além de regularem diretamente a endocrinologia reprodutiva dos machos através da secreção de uma grande variedade de produtos. Estes fatores secretados pelas células de Sertoli podem ser classificados como: nutricionais (ex.: proteínas de transporte), que suportam os requerimentos nutricionais das células germinativas; ambientais (ex.: matriz extracelular), que influenciam o ambiente extracelular entre as células; e os regulatórios (fatores de crescimento) (SKINNER; GRISWOLD, 2005). As células de Sertoli apresentam receptores para o hormônio folículoestimulante (FSH) e testosterona, transduzindo esses sinais endócrinos e outros sinais celulares para a regulação parácrina das

células germinativas (GRISWOLD, 1993; XIAO et al., 2014). As células de Sertoli produzem ativina e inibina, responsáveis pela ativação e inibição da liberação de FSH. Sob estímulo do FSH as células de Sertoli produzem ABP, proteína de ligação ao andrógeno, que mantém a testosterona por mais tempo no túbulo seminífero (PLANT; MARSHALL, 2001; BARAKAT et al., 2012).

O núcleo da célula de Sertoli é uma das suas organelas mais distinguíveis (HESS; FRANÇA, 2005; HESS; VOGL, 2015), pois é grande e capaz de mudar de forma através do ciclo do epitélio seminífero, geralmente exibindo profundas invaginações da membrana nuclear (FRANÇA et al., 2016).

O citoesqueleto das células de Sertoli é formado de elementos primários que incluem os microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários (vimentina). As funções gerais desses elementos são bem conhecidas e incluem manutenção da forma e polaridade celular, movimentação ou posicionamento das organelas intracelulares, formação de pseudópodes e outras extensões citoplasmáticas. Além disso, realiza a ancoragem das células germinativas e sua translocação através dos diferentes estágios do desenvolvimento, além do cuidado e preparação das espermátides maduras para sua liberação do epitélio para o lúmen do túbulo seminífero. Esses elementos encontram-se ainda presentes entre as conexões com as células germinativas providenciando uma comunicação célula-a-célula através das especializações ectoplasmáticas, dos complexos-tubulobulbares e dos processos penetrantes. Permitindo assim, orientação espacial, sustentação, aumento das superfícies de contato para trocas metabólicas e movimentação das células germinativas (RUSSELL et al., 1990a; HESS; FRANÇA, 2005).

As células de Sertoli fazem a compartimentalização do epitélio seminífero, dividindo-o em ambientes permanente (basal e adluminal) e transitório (intermediário), o qual é formado durante o trânsito de células em leptóteno, do ambiente basal para o adluminal e envolve sucessivas formações e desarranjos das junções de oclusão. A barreira hematotesticular impede o contato de imunoglobulinas e células do sistema imune, protegendo as células da linhagem germinativa e espermatozoides do ataque imunológico (CHENG; MRUK, 2012; STANTON, 2016). Porém, junções entre células de Sertoli e células germinativas, bem como as junções entre as células mioides, contribuem para aumentar a eficiência da barreira. Essas junções são junções de adesão como desmossomos e junções do tipo GAP, que também contribuem para a função dessa barreira (FRANÇA et al.,

2016). Os desmosomos mantêm a integridade do epitélio seminífero, e ao mesmo tempo, asseguram que as células germinativas sejam transportadas de forma ordenada em direção ao lúmen tubular em virtude de mudanças configuracionais das células de Sertoli. As junções do tipo GAP representam avenidas cruciais para o transporte de pequenas substâncias das células de Sertoli para as células germinativas (RUSSELL, 1980). A barreira das células de Sertoli é responsável pela separação do epitélio seminífero em dois ambientes: o basal e o adluminal. Esta barreira separa as células germinativas avançadas do suprimento de sangue, o que impede a passagem de leucócitos para dentro dos túbulos seminíferos. Permite também que as células de Sertoli controlem a passagem de moléculas através da barreira, criando um microambiente único e isolado do sistema imune para as células germinativas (FRANÇA et al., 2016).

O número total de células de Sertoli estabelece o limite da produção de espermatozoides pelo testículo e a eficiência espermatogênica está correlacionada com a capacidade de suporte das células de Sertoli (HESS; FRANÇA, 2005). A auto renovação e diferenciação das espermatogônias dependem de microambientes especializados chamados de nichos. A célula de Sertoli é o contribuinte mais importante para a formação desses nichos (FRANÇA et al., 2016). As funções centrais das células de Sertoli são: formação da barreira de células de Sertoli; promoção de suporte estrutural e nutricional às células germinativas em desenvolvimento; fagocitose de corpos residuais e células germinativas degeneradas; produção e liberação de fatores regulatórios e formação de um ambiente imunoprivilegiado (OLIVEIRA; ALVES, 2015).

As células de Sertoli secretam o fluido luminal que é o meio pelo qual os espermatozoides são transportados dentro dos sistemas de ductos.

### **3.9 Células de Leydig**

Em mamíferos existem dois tipos de células de Leydig, células de Leydig fetal e adultas. As células de Leydig fetal se originam nos mesonefros e são responsáveis pela produção de andrógenos para masculinização fetal, as quais degeneram após o nascimento. As células de Leydig adultas se diferenciam após o nascimento e, parecem não estar relacionadas com as células de Leydig fetais (WILHELM et al., 2007). Essa duas populações distintas de células de Leydig são responsáveis pelos

períodos de esteroidogênese testicular: durante o período fetal-neonatal (células do tipo fetal) e no adulto (células do tipo adulto), que diferem em sua morfologia, produção hormonal, regulação parácrina e funções fisiológicas (PAYNE; HARDY, 2007). No início do desenvolvimento, a proliferação das células de Leydig fetais e sua produção de hormônios esteroides são reguladas pela célula de Sertoli e macrófagos (COOKE, 1996). Sugere-se que macrófagos testiculares secretam citocinas, tais como, interleucina 1 e TGF $\beta$ , que podem estimular os progenitores dessas células (GE et al., 1996). A produção ativa de testosterona inicia-se durante o período fetal e é essencial para a diferenciação masculina normal. Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular, de maneira geral a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante neste compartimento (PAYNE; HARDY, 2007).

Nos testículos dos mamíferos, as células de Leydig sintetizam andrógenos que incluem a testosterona e a diidrotestosterona. A testosterona é requerida em altas concentrações nos testículos a fim de sustentar a espermatogênese nos túbulos seminíferos, promover a diferenciação do trato genital masculino, além de promover e manter os caracteres sexuais secundários. Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (LUKE; COFFEY, 1994; FAN; ROBAIRE, 1998; GOYAL et al., 1999). A síntese de andrógenos é controlada por hormônios produzidos pela hipófise, mais especificamente o hormônio luteinizante (LH), ligando-se a receptores presentes na membrana das células de Leydig. Esta ligação desencadeia, através da ativação de proteínas quinases, uma série de reações intracelulares que culminam com a síntese do andrógeno (MEINHARDT; HEDGER, 2011).

### **3.10 Estresse oxidativo**

O conceito de estresse oxidativo foi introduzido em 1985 por Sies (1985), sendo definido como desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelos sistemas de proteção antioxidante (PERSON et al., 2014).

A principal fonte de ROS está na cadeia transportadora de elétrons, na membrana interna mitocondrial, onde a energia é gerada na forma de ATP (DRÖGE,

2002; BROOKES et al., 2004; ADAM-VIZI, 2005; ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006; CAMELLO-ALMARAZ et al., 2006; DOUGHAN; DIKALOV, 2007; FATO et al., 2008). Nesse processo de fosforilação oxidativa, os elétrons de alta energia são transferidos da NADH e FADH<sub>2</sub>, ao longo da cadeia transportadora de elétrons até o oxigênio (O<sub>2</sub>), que finalmente gera água (KOOPMAN et al., 2010).

Como o funcionamento celular normal é dependente de reações de oxidorredução e esse processo é feito geralmente em etapas, surge a oportunidade da formação de compostos intermediários com elétrons desemparelhados denominados de radicais livres. O fato desses compostos apresentarem elétrons desemparelhados os tornam muito reativos a qualquer outro tipo de molécula como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (SIES; CADENAS, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992; DOORN; PETERSEN, 2003). A maioria dos radicais livres em sistemas biológicos são derivados do oxigênio, mas também há derivados de nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio, RNS) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). ROS e RNS são termos utilizados coletivamente para descrever radicais altamente reativos de oxigênio e nitrogênio, bem como derivados não radicais. Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O<sub>2</sub> e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, os quais provocam a redução incompleta de O<sub>2</sub> (GODIC et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são representadas por radicais livres como superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroxil (OH<sup>•</sup>), peroxil (ROO<sup>•</sup>), alcoxil (RO<sup>•</sup>) e moléculas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxigênio simpleto (1/2 O<sub>2</sub>) e ozônio (O<sub>3</sub>) (GANDHI; ABRAMOV, 2012; RAY et al., 2012). As ROS são resultantes do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), sendo o O<sub>2</sub> a principal fonte de radicais livres da célula (RIBEIRO et al., 2005).

Todas as células em organismos eucarióticos contêm poderosas enzimas antioxidantes (SIES, 1997). Por meio da ação das enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), o organismo mantém a concentração de ROS dentro dos limites fisiológicos, o que forma o mecanismo antioxidante enzimático (RIBEIRO et al., 2005). A SOD converte enzimaticamente o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (DROGE, 2002), enquanto a CAT é responsável pela decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (AEBI,

1984). Antioxidantes exógenos, componentes da dieta, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo (RIBEIRO et al., 2005). Antioxidantes como a vitamina C e E, carotenoides e fenólicos são atualmente considerados os principais antioxidantes exógenos (FALLAHI et al., 2015). Entretanto, alguns tipos de alimentos podem induzir a liberação de radicais livres quando metabolizados pelas células e produzir lesões (POLJSAK; MILISAV, 2012).

As moléculas lipídicas constituem entre 30 e 80% da massa das membranas biológicas, sendo proteínas (20-60%) e às vezes carboidratos (0-10%) (CATALÁ, 2009). O estresse oxidativo ocorre nas células devido a um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante/antioxidante, produzindo lesões celulares, porque os ROS podem reagir com proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios (SIES; CADENAS, 1985). Entre estes alvos, a peroxidação de lipídios é extremamente prejudicial, porque a formação de produtos de peroxidação lipídica leva à propagação de reações de radicais livres. O processo geral de peroxidação lipídica consiste em três estágios: iniciação, propagação e terminação (CATALÁ, 2006). Os lipídios poli-insaturados podem sofrer ataques de radicais livres, que transferem o elétron para um carbono do lipídio, originando um L<sup>o</sup> (lipídio com um radical livre centrado em carbono). O L<sup>o</sup> reage com O<sub>2</sub>, originando um radical lipoperoxila (L<sup>o</sup> + O<sub>2</sub> → <sup>•</sup>LOO<sup>o</sup>). O radical <sup>•</sup>LOO<sup>o</sup> pode agir sobre outro lipídio, transferindo o elétron desemparelhado para um carbono, originando um novo L<sup>o</sup>, e assim sucessivamente (*peroxidação em cadeia*), alterando várias moléculas lipídicas de membranas. Ao atuar em outros lipídios, LOO<sup>o</sup> transforma-se em um hidroperóxido (LOOH), que pode se decompor em aldeídos (malondialdeído e 4-hidroxinonenal), hidrocarbonetos voláteis, como etano e pentano, que são também produtos finais da peroxidação de lipídios insaturados (CATALÁ, 2006). A principal repercussão da peroxidação lipídica são lesões de membranas celulares (BENZIE, 1996; NIGAM; SCHEWE 2000).

O malondialdeído (MDA) é um dos vários produtos finais de baixo peso molecular formados através da oxidação lipídica, sendo importante marcador de estresse oxidativo, determinado para quantificar a peroxidação lipídica em amostras (JANERO, 1990).

O estresse oxidativo é um fator chave envolvido na infertilidade masculina. As ROS podem ter efeito positivo ou negativo na viabilidade do espermatozoide. Isto depende da concentração e do tempo de exposição a esses radicais. Fisiologicamente,

é produzida pequena quantidade de ROS necessária para a capacitação (processo em que o espermatozoide se torna capaz de penetrar nos óvulos), motilidade e fertilidade dos espermatozoides. Entretanto, o aumento de ROS resulta em prejuízo, como perda da motilidade e disfunção das organelas, como exemplo a mitocôndria (FALLAHI et al., 2015).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e processamento do material botânico

A coleta do cipó-cravo (*T. fasciculatus*) foi realizada no mês de setembro de 2014, no setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (20°45'S, 42°55'W), Viçosa, Minas Gerais, Brasil (altitude de 600 a 800m). O material coletado foi identificado e autenticado por comparação com espécimes do Horto Botânico da UFV, onde espécime testemunho foi depositado (exsicata nº 30.074).

A preparação do extrato alcoólico do caule de *T. fasciculatus* (EATF) e as análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Fragmentos do caule de cipó-cravo foram secos em estufa, em temperatura de 40°C, para posterior moagem e preparo do extrato alcoólico. O extrato foi obtido a partir de 200g de raiz triturada, deixado em maceração por 24h em álcool etílico 99% e, em seguida, submetida à percolação com o mesmo solvente. Após extração exaustiva, o extrato foi levado ao evaporador rotativo com pressão reduzida (BUCHI – Rotavapor R-3) e, em seguida, liofilizado (liofilizador VirTis BenchTop K) para completa remoção do solvente, apresentando um rendimento de 8,3%.



**Figura 1:** Caule do cipó-cravo *T. fasciculatus* Miers (Fonte: Stela Murgel/Unifesp)

#### 4.2 Prospecção fitoquímica

Para a prospecção fitoquímica, aproximadamente 25 mg do extrato foi transferido para frasco de vidro (capacidade 5 mL) e solubilizado em etanol 99%. Com o auxílio de capilares de vidro, o extrato foi aplicado em placas de vidro recobertas com sílica (sílica gel 60, MACHEREY-NAGEL®, espessura de 0,25 mm) ou em cromatofolhas em alumínio (com indicador fluorescente 254 nm, SIGMA-ALDRICH®). As prospecções fitoquímicas foram realizadas para as classes de compostos listadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Classes de metabólitos secundários investigadas no extrato alcoólico do caule de *T. fasciculatus*.

Classes	Padrão	Reagente Revelador
Fenólicos	Ácido pirogálico	Reagente de Barton
Flavonoides	Rutina	NP/PEG
Saponinas	Ácido 18- $\beta$ -glicirretínico	Anisaldeído sulfúrico
Cumarinas e Antraquinonas	Venalot®	Hidróxido de potássio a 5%
Triterpenos/esteroides	$\beta$ -sitosterol	Reagente de Lieberman-Burchard
Alcaloides	Quinina	Reagente de Dragendorff

### 4.3 Perfil Cromatográfico do extrato em HPLC

O perfil cromatográfico ou impressão digital (*fingerprint*), foi determinado com auxílio de HPLC com detector DAD Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A, software LabSolutions). A mesma amostra utilizada para o perfil fitoquímico foi utilizada para o perfil cromatográfico. O álcool etílico foi retirado da amostra com o auxílio de um evaporador rotatório e em seguida a amostra foi ressuspensa em álcool metílico, com pureza HPLC.

Utilizando seringas descartáveis (3 mL) e filtros milipore (20 µm) foram recolhidos 3 mL de cada extrato. O volume de primeira passagem no filtro foi descartado (1 mL) e o restante foi transferido para vials (1,5 mL), que foram hermeticamente fechados e alocados no injetor automático de amostras do HPLC. A coluna utilizada nas eluições (Shimpack®, 15 cm por 4,6 mm) foi de fase reversa (C-18). As condições de corrida foram: tempo de corrida- 60 min, Fase Móvel gradiente de 5% a 95% de MeOH (Fase A: H<sub>2</sub>O e Fase B: MeOH).

### 4.4 Delineamento Experimental

Foram utilizados 40 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, pesando entre 35 e 45g, em idade reprodutiva (80 dias), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em ambiente de temperatura (22 ± 2°C), umidade (60 - 70%) e luz controladas, em ciclo claro-escuro (12/12 h), tendo acesso ao alimento e água *ad libitum*.

Os animais foram pesados, colocados em gaiolas individuais e distribuídos de maneira aleatória em quatro grupos experimentais (n=10): Grupo 1 - controle (água); Grupo 2 - EATF 100, extrato alcoólico do caule de *T. fasciculatus* na dosagem de 100mg/Kg de peso corporal (PC); Grupo 3 - EATF 200, extrato alcoólico do caule de *T. fasciculatus* na dosagem de 200 mg/Kg de PC; Grupo 4 - EATF 300, extrato alcoólico do caule *T. fasciculatus* na dosagem de 300 mg/Kg de PC. As dosagens utilizadas neste ensaio foram baseadas em estudo prévio realizado por Melo et al. (2010).

Os animais foram expostos aos tratamentos por um período de 42 dias, sendo todos os tratamentos administrados por gavagem, através de cânula de metal orofaríngea. Os procedimentos experimentais seguiram as determinações da

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo N° 62/2014).

#### **4.5 Coleta de amostras**

Após 24h da última gavagem, os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se cloridrato de xilazina (2mg/kg/IP) e cloridrato de quetamina (10mg/kg/IP). O sangue foi obtido via punção cardíaca, sendo posteriormente centrifugado e o soro armazenado em ultrafreezer para análises posteriores. Em seguida, foram removidos e pesados os órgãos do aparelho reprodutor masculino. O testículo direito foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer para análises enzimáticas posteriores e o esquerdo fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4), para análises histomorfométricas em microscopia de luz.

#### **4.6 Microscopia de luz**

Fragmentos de testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e, a seguir, incluídos em hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica) (CHIARINI-GARCIA et al., 2011). Utilizando-se micrótomo rotativo (Reichert-Jung) e navalha de vidro, foram feitos cortes histológicos semisseriados de 1µm de espessura mantendo-se um intervalo de 40µm para evitar a repetição das análises na mesma região. As secções obtidas foram coradas em Hematoxilina e Eosina. Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image Pro-Plus 4 (Media Cybernetics).

#### **4.7 Análises morfométricas dos testículos**

##### **4.7.1 Dados biométricos**

Após fixação, os testículos foram pesados em balança de precisão (BEL Mark 160/0,0001g). Para determinar o peso do parênquima testicular a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular, foram calculados os índices gonadossomático (IGS) e parenquimossomático (IPS), a partir das fórmulas  $IGS =$

$PG/PC \times 100$  e  $IPS = P_{par}/PC \times 100$ , onde PG = peso das gônadas, Ppar = peso do parênquima e PC = peso corporal.

#### **4.7.2 Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo**

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 2.660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 10X, realizando-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos, nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Para cálculo dos volume de epitélio seminífero, túbulo e intertúbulo utilizou-se a fórmula:  $\text{Volume} = \% \text{ de epitélio seminífero, \% túbulo ou intertúbulo} / 100 \times \text{peso do parênquima de 1 testículo}$ .

Baseado nos volume de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula  $ITS = VT/PC \times 100$ , onde VT = volume de túbulo seminífero e PC = peso corporal.

O peso do testículo foi considerado igual ao volume, pois em mamíferos, se entende que a densidade testicular está próxima de 1 (JOHNSON et al., 1981; LUKE; COFFEY, 1994; TAE et al., 2005)

#### **4.7.3 Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero**

Para mensurar o diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero foi utilizado o programa Image Pro-Plus 4 (Media Cybernetics). O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, independente do estágio em que se encontravam. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, através de duas medidas diametralmente opostas, a partir da túnica própria até o lúmen tubular, sendo apresentada a média desses valores.

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

O comprimento total, em metros, dos túbulos seminíferos por testículo foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a seguinte fórmula (ATTAL; COURT, 1963; DORST; SAJONSKI, 1974)  $CT = VTS/\pi R^2$ , onde VTS = volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos; R = diâmetro tubular/2.

O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula:  $CT/g = \text{Comprimento total de túbulos (m)} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$ .

#### **4.7.5 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero**

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio I do ciclo, classificado de acordo com o método da morfologia tubular (SWIERSTRA, 1968; COUROT et al., 1970; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT et al., 1977; CURTIS; AMANN, 1981; AMANN; SCHANBACHER, 1983) foi feita a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Foram utilizadas 10 secções transversais de túbulos para cada animal, sendo contados os núcleos ou nucléolos dos seguintes tipos celulares:

- ✓ Espermatogônias do tipo A (SGA);
- ✓ Espermatócitos I, na fase de preleptóteno/leptóteno (PL/L);
- ✓ Espermatócitos I, na fase de paquíteno (PAQ);
- ✓ Espermátides arredondadas (EAR);
- ✓ Sertoli (SER).

As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1962):  $NCEI = \text{contagem obtida} \times (\text{espessura do corte} / \text{espessura do corte} + \text{raiz quadrada} [(DM/2)^2 - (DM/4)^2])$ , onde NCEI é o número corrigido de células no estágio 1, e DM é o diâmetro médio de cada tipo celular.

Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celulares estudados, para cada animal, em aumento de 40x. Para a espermatogônia do tipo A, que apresenta núcleo elipsoide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o diâmetro nuclear maior e o menor. O número de células de Sertoli foi corrigido para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Assim, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente (AMANN; ALMQUIST, 1962).

#### **4.7.6 Razões entre os números celulares**

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli nos animais tratados e controle, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e entre estes números e o número de células de Sertoli no estágio I do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram utilizadas:

- ✓ Espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno: espermatogônias, obtendo-se o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
- ✓ Espermátides arredondadas: espermatogônias, obtendo-se o rendimento geral da espermatogênese;
- ✓ Espermátides arredondadas: espermatócitos primários em paquíteno, obtendo-se o índice meiótico;
- ✓ Espermátides arredondadas: nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se o índice de célula de Sertoli que mede a eficiência desta célula;
- ✓ Número total corrigido de células germinativas: nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se a capacidade total de suporte da célula de Sertoli.

#### **4.7.7 Número de células de Sertoli por testículo**

A estimativa do número de células de Sertoli por testículo (CST) foi realizada a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, de acordo com a equação (HOCHEREAU-DE REVIERS; LINCOLN, 1978):  $CST = (CTT/T \times SER) / EC$ , onde CTT/T= comprimento total de túbulo por testículo, SER= número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal e EC= espessura do

corte. O número de células de Sertoli por grama de testículo (CS/gT) foi calculado a partir da equação:  $CS/gT = CST / PT$ , onde PT= peso testicular.

#### **4.7.8 Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo**

A produção espermática diária (PED) por testículo foi estimada de acordo com a seguinte equação desenvolvida por Amann (1970):  $PED = (VTS \times EAR) / (DC \times AST \times EC)$ , onde: VTS= volume total de túbulos seminíferos ( $\mu m^3$ ), EAR= número corrigido de espermátides arredondadas, DC= duração do ciclo do epitélio seminífero (dias), AST= área da secção transversal do túbulo seminífero e EC= espessura do corte histológico. A produção espermática diária por grama de testículo (PED/g) foi obtida a partir da fórmula:  $PED/gT = PED / PT$ , onde PT: peso testicular. A duração do ciclo do epitélio seminífero em camundongos é de nove dias (RUSSELL et al., 1990a), sendo uma constante biológica espécie-específica.

#### **4.8 Análises qualitativas e quantitativas histopatológicas**

Para se estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos foram contados 1.170 pontos projetados sobre imagens capturadas com objetiva de 10X, totalizando 10 campos aleatórios, nas preparações histológicas do testículo de cada animal (MATTA, 2012). Foram considerados túbulos com patologias aqueles que apresentavam qualquer alteração segundo (RUSSELL et al., 1990b; CREASY, 2001; BOEKELHEIDE, 2005). A classificação das alterações patológicas foram adaptadas de Matta (2012), de acordo com a gravidade, como descrito abaixo:

Nível 1: Túbulos seminíferos íntegros com células germinativas dispostas no seu sítio de localização e poucos vacúolos univesiculares;

Nível 2: Túbulos seminíferos apresentando vacúolos uni e multivesiculares nas células de Sertoli e desprendimento das células espermatozóides do epitélio;

Nível 3: Células espermatozóides livres no interior do lúmen;

Nível 4: Túbulos seminíferos apresentando lúmen com aspecto aumentado refletindo a perda celular, alguns túbulos contendo apenas células do ambiente basal, túbulos seminíferos atrofiados.

## **4.9 Análise Morfométrica e estereológica do intertúbulo**

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

A proporção volumétrica do intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 2660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 10X, realizando-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. A proporção volumétrica intertubular foi calculada utilizando-se a seguinte equação:  $IT (\%) = (NT / NTT) \times 100$ , onde NT = registro do número de pontos sobre o intertúbulo e NTT= número total de pontos contados.

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 40X, realizando-se a contagem de campos aleatoriamente distribuídos, nas preparações histológicas do testículo de cada animal.

No intertúbulo foram investigadas as células de Leydig, tanto núcleo como citoplasma, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo, obtendo-se as proporções volumétricas entre estes por meio da equação:  $Proporção\ volumétrica (\%) = (\%IT \times \%PVI) / 100$ , onde %IT= proporção volumétrica no testículo de intertúbulo e %PVI= proporção volumétrica do componente no intertúbulo.

Para cálculo do volume do intertúbulo, bem como dos elementos que o compõe, utilizou-se a fórmula:  $Volume = \% \text{ de intertúbulo ou de um elemento no testículo} \times PPT/100$ , onde: PPT = peso do parênquima de 1 testículo.

### **4.9.2 Diâmetro nuclear, volume nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo**

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

$\%CL \times VNL / \%NL$ , onde  $\%CL$  = proporção volumétrica de citoplasma de Leydig e  $\%NL$  = proporção volumétrica de núcleo de Leydig;  $VL = VNL + VLC$ .

O volume que a célula de Leydig ocupa por testículo (VLT), em  $\mu L$ , foi calculado a partir da fórmula:  $VLT = (\%Ley \times PPT) / 100$ , onde  $\%Ley$  = proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e PPT = peso do parênquima de 1 testículo. O volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (VL/gT), em  $\mu L$ , foi calculado a partir da fórmula:  $VL/gT = VLT/PT$ , onde VLT = volume que a célula de Leydig ocupa por testículo, e PT = peso de 1 testículo.

De posse do volume individual da célula de Leydig e do volume total ocupado por estas células no testículo, foram calculados o número de células de Leydig por testículo (NL) e por grama de testículo (NLg/T), por meio da seguinte equação:  $NL = VLT / VL$ , onde: VLT = volume de Leydig por testículo e VL = volume de uma célula de Leydig.  $NLg/T = NL / PT$ , onde PT = peso de 1 testículo.

#### **4.9.3 Índice Leydigossomático**

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

### **4.10 Atividade das enzimas antioxidantes e determinação de malondialdeído**

Fragmentos de testículo (100 mg) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com 1M Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) e a suspensão centrifugada a 13,8 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

#### **4.10.1 Determinação da Superóxido Dismutase**

A atividade da SOD foi mensurada nos homogenatos em leitor de microplacas ( $\lambda = 570nm$ ) baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido  $O_2^-$  e o peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Os resultados foram expressos nmol/g (DIETERICH et al., 2000).

#### **4.10.2 Determinação de Catalase**

A atividade da CAT foi mensurada segundo Aebi (1984). A enzima foi determinada pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 7,0) e homogenato de tecido em espectrofotômetro ( $\lambda = 240\text{nm}$ ). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e  $240 = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  e os resultados expressos em  $\mu\text{mol/g/min}$ .

#### **4.10.3 Determinação do Malondialdeído**

A concentração de malondialdeído (MDA) foi estimada conforme descrito por Wallin et al. (1993). O homogenato dos tecidos foi preparado como descrito acima para as enzimas. Brevemente, 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante dos tecidos foram homogeneizados a 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0.375%) / ácido clorídrico (0.25 M), aquecido por 40 minutos em água fervente (90°C) e em seguida resfriado. Após resfriar, foi acrescentado álcool butílico (600  $\mu\text{L}$ ), agitado em vortex por ~2 minutos e em seguida centrifugado (10 minutos a 0,9 g). A fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ( $\lambda = 532\text{nm}$ ). A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M/g}$  (WALLIN et al., 1993).

#### **4.11 Testosterona sérica**

A concentração plasmática de testosterona foi obtida pelo método de quimioluminescência, utilizando-se kit Access<sup>®</sup> Testosterone (Beckman, USA). Os resultados foram expressos em ng/dL.

#### **4.12 Análises estatísticas**

Análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK), foi usada para comparar médias entre os grupos experimentais. Todos os

resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância considerado foi de  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Prospecção Fitoquímica

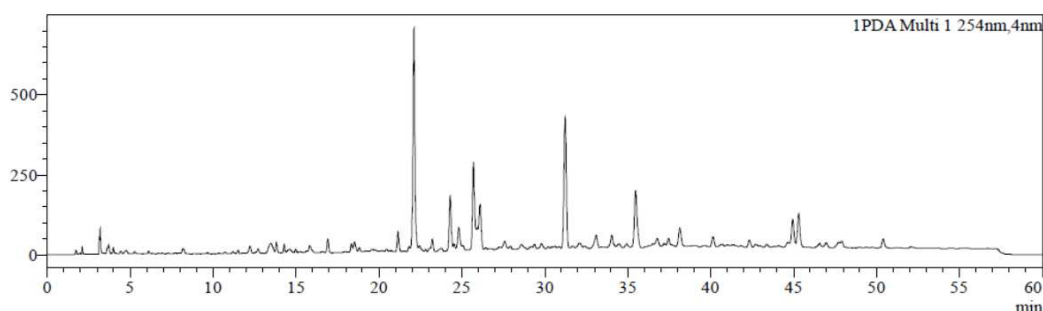
Ainda que se saiba a constituição fitoquímica básica de *T. fasciculatus*, é de suma importância a confirmação desses componentes no extrato utilizado (Tabela 5).

**Tabela 5.** Prospecção fitoquímica do extrato alcoólico de *T. fasciculatus*

Composto	Presença (+) ou Ausência (-)
Alcaloides	( - )
Antraquinonas	( - )
Cumarinas	( + )
Taninos	( + )
Saponinas	( + )
Esteroides	( + )
Flavonoides	( + )

### 5.2 Fingerprint I do extrato do caule de *T. fasciculatus*

Por se tratar de um instrumento analítico importante para monitorar a qualidade das matérias primas de produtos fitoterápicos, o *fingerprint* do extrato da raiz trouxe considerações relevantes quanto a composição química da raiz da planta. As condições cromatográficas aplicadas mostraram-se adequadas para a obtenção de cromatogramas que permitissem a visualização de diferentes picos nos extratos, sendo possível identificar um composto majoritário ainda não identificado (Figura 1).



**Figura 2.** Cromatograma do extrato alcoólico do caule de *T. fasciculatus*.

### 5.3 Biometrias corporal e testicular

Os dados biométricos estão dispostos na Tabela 6. Não houve alteração no peso corporal (PC) entre os animais componentes dos diferentes grupos.

O peso testicular total (PTT) e o peso do parênquima testicular (PPAR) aumentaram nos grupos EATF100 e EATF200 em relação aos grupos Controle e EATF300. O peso da albugínea (PALB) apresentou redução nos grupos EATF200 e EATF300 em relação ao EATF100 e ao grupo controle.

**Tabela 6.** Parâmetros biométricos testiculares de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
<b>PC(g)</b>	45,40±1,8 <sup>a</sup>	47,80±4,60 <sup>a</sup>	41,80±5,17 <sup>a</sup>	44,00±3,74 <sup>a</sup>
<b>PTT(g)</b>	0,232±0,02 <sup>a</sup>	0,324±0,019 <sup>b</sup>	0,288±0,020 <sup>b</sup>	0,228±0,020 <sup>a</sup>
<b>PPAR(g)</b>	0,110±0,01 <sup>a</sup>	0,156±0,01 <sup>b</sup>	0,141±0,01 <sup>b</sup>	0,111±0,01 <sup>a</sup>
<b>PALB</b>	0,006±0,00 <sup>a</sup>	0,006±0,000 <sup>a</sup>	0,003±0,002 <sup>b</sup>	0,003±0,002 <sup>b</sup>

PC = peso corporal; PTT = peso testicular total; PPAR = peso parênquima (relativo a um testículo); PALB = peso albugínea; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.4 Morfometria Tubular

Os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) aumentaram nos grupos EATF100 e EATF200 em relação ao EATF300 e ao grupo controle (Tabela 7).

**Tabela 7.** Índice gonadossomático (IGS), índice parenquimossomático (IPS), índice tubulossomático (ITS) e índice epiteliossomático (IES) de camundongos Swiss a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
IGS (%)	0,51±0,02 <sup>a</sup>	0,68±0,08 <sup>b</sup>	0,72±0,05 <sup>b</sup>	0,52±0,05 <sup>a</sup>
IPS (%)	0,48±0,05 <sup>a</sup>	0,65±0,08 <sup>b</sup>	0,68±0,06 <sup>b</sup>	0,50±0,06 <sup>a</sup>
ITS (%)	0,44±0,02 <sup>a</sup>	0,60±0,05 <sup>b</sup>	0,64±0,03 <sup>b</sup>	0,46±0,03 <sup>a</sup>
IES (%)	0,41±0,05 <sup>a</sup>	0,54±0,04 <sup>b</sup>	0,57±0,03 <sup>b</sup>	0,42±0,03 <sup>a</sup>

EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

As proporções volumétricas de túbulo seminífero (TS), epitélio seminífero (ES) e lúmen tubular (LT) não apresentaram diferenças entre os grupos. Porém, a túnica própria (TP) aumentou nos grupos EATF100 e EATF200 em relação a EATF300 e grupo controle (Tabela 8).

**Tabela 8.** Proporção volumétrica dos componentes tubulares de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
TS (%)	92,96±2,67 <sup>a</sup>	92,26±1,45 <sup>a</sup>	93,07±2,01 <sup>a</sup>	92,30±1,12 <sup>a</sup>
ES (%)	86,45±5,10 <sup>a</sup>	83,80±1,09 <sup>a</sup>	84,06±1,44 <sup>a</sup>	83,38±1,53 <sup>a</sup>
LT (%)	5,09±1,92 <sup>a</sup>	6,42±0,64 <sup>a</sup>	6,89±0,90 <sup>a</sup>	7,06±0,59 <sup>a</sup>
TP (%)	1,42±0,63 <sup>a</sup>	2,05±0,18 <sup>b</sup>	2,11±0,30 <sup>b</sup>	1,85±0,17 <sup>a</sup>

TS = túbulo seminífero; ES = epitélio seminífero; LT = lúmen tubular; TP = túnica própria; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Os volumes dos componentes tubulares estão dispostos na Tabela 9. O volume de túbulo seminífero (VTS), epitélio seminífero (VES) e túnica própria (VTP) apresentaram aumento nos grupos EATF100 e EATF200 em relação a EATF300 e grupo controle. O volume de lúmen tubular (VLT) apresentou aumento nos grupos EATF100, EATF200 e EATF300 em relação ao grupo controle e aumento em EATF100 e EATF200 comparados ao EATF300.

**Tabela 9.** Volume dos componentes tubulares dos testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
<b>VTS (mL)</b>	0,10± 0,008 <sup>a</sup>	0,14±0,018 <sup>b</sup>	0,13±0,008 <sup>b</sup>	0,10±0,011 <sup>a</sup>
<b>VLT(mL)</b>	0,005±0,002 <sup>a</sup>	0,008± 0,0012 <sup>c</sup>	0,009± 0,0012 <sup>c</sup>	0,007± 0,0004 <sup>b</sup>
<b>VES(mL)</b>	0,09± 0,008 <sup>a</sup>	0,13± 0,008 <sup>b</sup>	0,11± 0,006 <sup>b</sup>	0,09± 0,010 <sup>a</sup>
<b>VTP(mL)</b>	0,001± 0,0007 <sup>a</sup>	0,003± 0,0002 <sup>b</sup>	0,003± 0,0006 <sup>b</sup>	0,002± 0,0004 <sup>a</sup>

VTS = volume de túbulo seminífero; VLT = volume de lúmen tubular; VES = volume de epitélio seminífero; VTP = volume de túnica própria; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Altura de epitélio seminífero (AE), diâmetro tubular (DT), comprimento total dos túbulos seminíferos (CTS/T) e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo (CTS/g) estão dispostos na Tabela 10. Os parâmetros AE, DT e CTS/g não apresentaram alteração entre os grupos avaliados. O CTS/T apresentou aumento em EATF100 e EATF200 comparados ao EATF300 e grupo controle.

**Tabela 10.** Altura de epitélio seminífero (AE), diâmetro tubular (DT), comprimento total dos túbulos seminíferos (CTS/T) e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo (CTS/gT) de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
<b>AE(µm)</b>	76,22±4,32 <sup>a</sup>	76,87±2,29 <sup>a</sup>	75,59±4,98 <sup>a</sup>	77,75±2,41 <sup>a</sup>
<b>DT(µm)</b>	208,03±17,84 <sup>a</sup>	204,26±8,28 <sup>a</sup>	199,11±12,48 <sup>a</sup>	206,68±7,60 <sup>a</sup>
<b>CTS/T</b>	3,08±0,73 <sup>a</sup>	4,39±0,41 <sup>b</sup>	4,33±0,79 <sup>b</sup>	3,06±0,49 <sup>a</sup>
<b>CTS/gT</b>	13,16±2,46 <sup>a</sup>	13,55±1,12 <sup>a</sup>	14,77±1,72 <sup>a</sup>	13,37±1,23 <sup>a</sup>

EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.5 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero

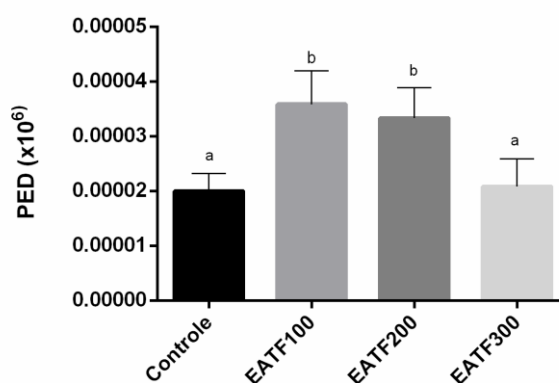
Os números corrigidos de espermatogônias (SGA), preleptóteno (PL/L), paquíteno (PAQ) e espermátides arredondadas (EAR) estão dispostos na Tabela 11.

Não houve alteração em SGA entre os grupos tratados e controle. Os parâmetros relativos a PL/L e PAQ aumentaram no EATF100 em relação demais grupos. O número de EAR aumentou no grupo EATF100 em relação a todos os grupos. No grupo EATF200 observou-se aumento se comparado ao controle, mas se manteve igual ao grupo EATF300, que também foi igual ao controle. Os dados referentes à produção espermática diária (PED) encontram-se na Figura 3, onde se observa aumento nos grupos EATF100 e EATF200 em relação ao controle.

**Tabela 11.** Números corrigidos de células de linhagem espermatogênica de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

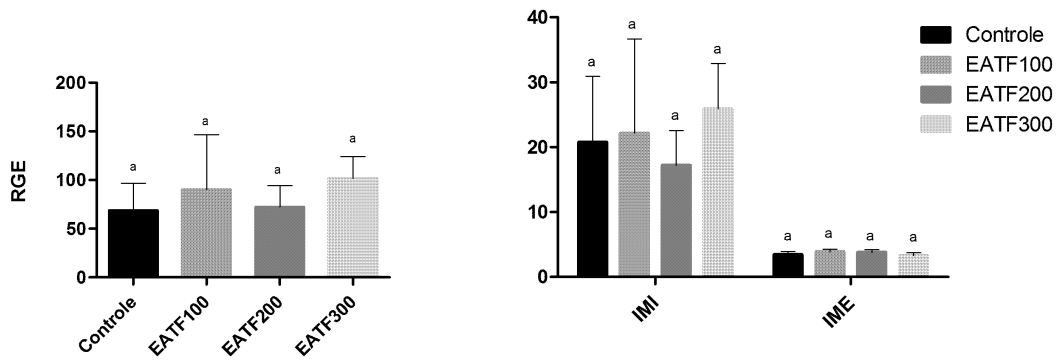
Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
SGA	0,90±0,24 <sup>a</sup>	1,33±0,70 <sup>a</sup>	1,09±0,17 <sup>a</sup>	0,66± 0,16 <sup>a</sup>
PL/L	16,95± 3,65 <sup>a</sup>	22,10±1,89 <sup>b</sup>	17,68±1,88 <sup>a</sup>	16,24± 0,33 <sup>a</sup>
PAQ	17,08±3,24 <sup>a</sup>	23,97±2,69 <sup>b</sup>	19,91± 3,27 <sup>a</sup>	19,79±1,08 <sup>a</sup>
EAR	57,14±5,57 <sup>a</sup>	92,38±10,68 <sup>c</sup>	75,88± 12,90 <sup>b</sup>	64,53±7,93 <sup>ab</sup>

SGA = espermatogônia, PL/L = espermatócito primário em preleptóteno/leptóteno, PAQ = espermatócito primário em paquíteno, EAR = espermátide arredondada; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).



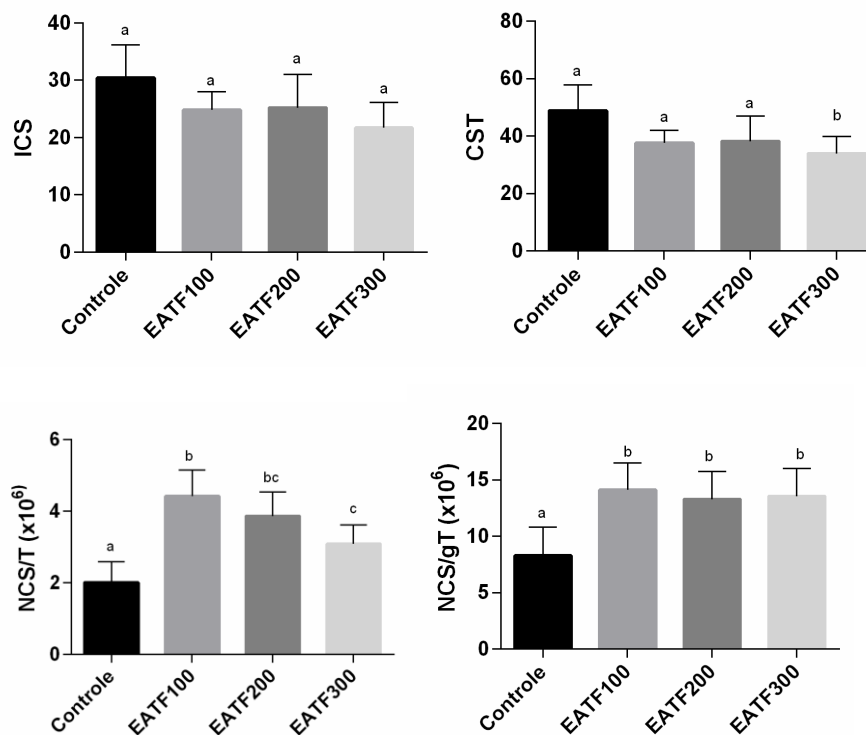
**Figura 3.** Produção espermática diária (PED) em testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Os parâmetros rendimento geral da espermatogênese (RGE), índice mitótico (IMI) e índice meiótico (IME), estão dispostos na Figura 4. Não houve alteração para esses parâmetros entre os grupos avaliados.



**Figura 4.** Rendimento geral da espermatogênese (RGE), índices mitótico (IMI) e meiótico (IME) do epitélio seminífero de testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

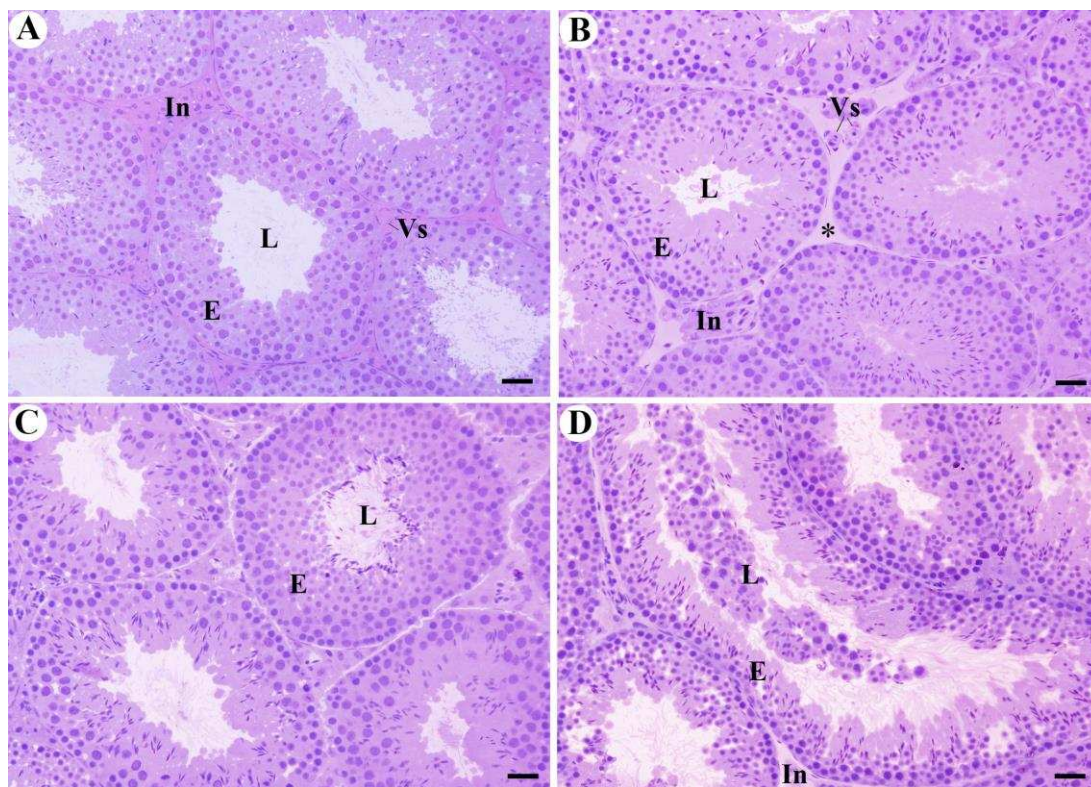
Os dados referentes à morfometria da célula de Sertoli estão dispostos na Figura 5. Não houve alteração para o índice de célula de Sertoli (ICS), mas a capacidade de suporte total (CST) reduziu no grupo EATF300 em relação ao grupo controle e aos outros grupos de tratamento. O número de célula de Sertoli por testículo (NCS/T) e número de célula de Sertoli por grama de testículo (NCS/gT) aumentou nos grupos tratados em relação ao grupo controle, sendo que (NCS/T) apresentou diferenças entre o EATF100 e o EATF300.



**Figura 5.** Morfometria da célula de Sertoli em testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF. (ICS) = índice de célula de Sertoli; CST = capacidade total de suporte; NCST/T = número de célula de Sertoli por testículo; NCS/gT= número de célula de Sertoli por grama de testículo. EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

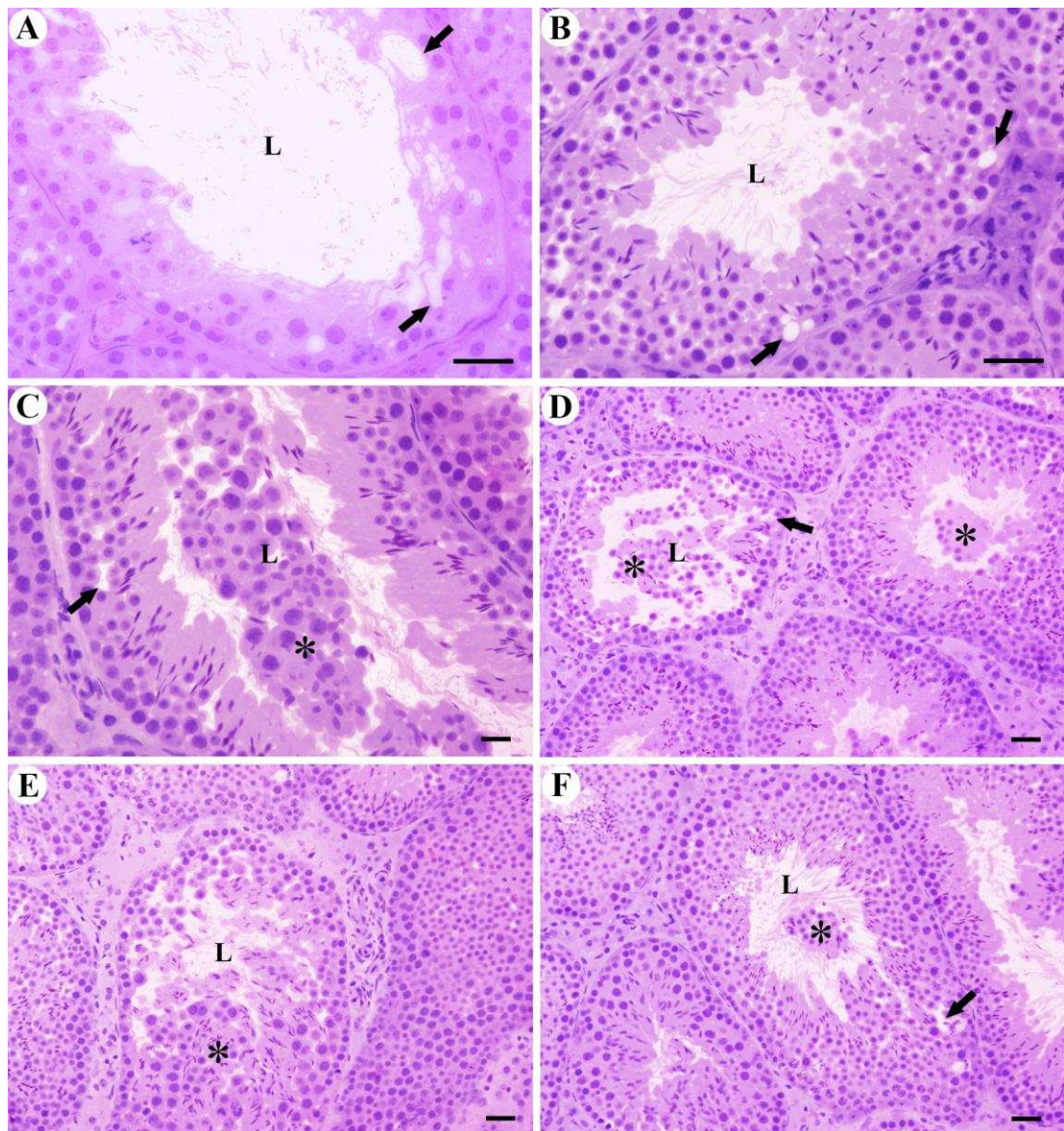
### 5.6 Análises quantitativas e qualitativas histopatológicas

Os animais do grupo controle e os animais que receberam o EATF100 e EATF200 apresentaram apenas alguns túbulos contendo pequenos vacúolos univesiculares, estando a maioria dos túbulos íntegros, com as células germinativas bem preservadas e epitélio seminífero bem organizado, determinando um arranjo normal (Figuras 6A, B e C). No grupo EATF300 foram observadas células germinativas no lúmen, indicando descamação e presença de vacúolos uni e multivesiculares, determinando um arranjo anormal de túbulos seminíferos (Figura 6D).



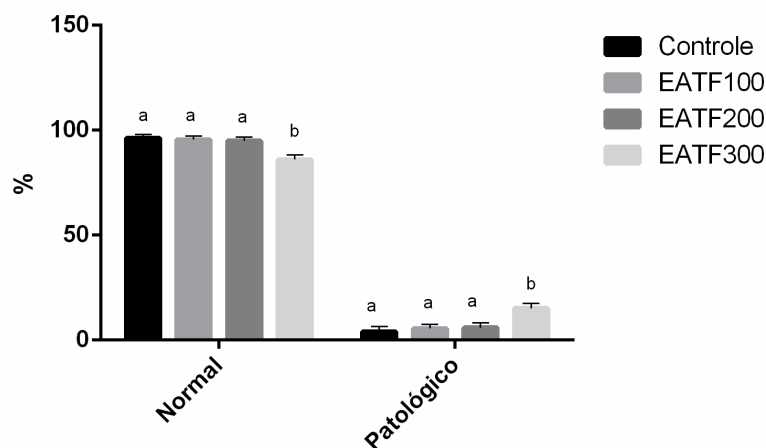
**Figura 6.** Fotomicrografias de testículos de camundongos Swiss. Grupo controle (A) e grupos tratados com 100, 200 e 300 mg/kg de extrato alcoólico de *T. fasciculatus*, figuras B, C e D, respectivamente. Nota-se a integridade da região tubular nos grupos controle, 100mg e 200mg. No grupo 300mg, figura D, observa-se a presença de células germinativas no lúmen (L), indicando descamação. Espaço linfático (\*), epitélio germinativo (E), intertúbulo (In) e vasos sanguíneos (Vs). Barras: 20µm. Coloração: HE.

Os animais do grupo controle, EATF100 e EATF200 enquadraram-se no nível 1 de classificação histopatológica, pois os vacúolos univesiculares, em baixa proporção, podem ocorrer em indivíduos saudáveis. Animais do grupo EATF300 apresentaram níveis de patologias 2, 3 e 4, tais como, lúmen aumentado (Figura 7A), vacúolos uni e multivesiculares nas células de Sertoli (Figura 7A, B, C e F), além de descamação de células germinativas oriundas do ambiente adluminal para o lúmen tubular (Figuras 7C, D e F). As células do ambiente basal permaneceram em seu sítio de localização juntamente com os núcleos das células de Sertoli (Figuras 7A, B, C, D, E e F).



**Figura 7.** Fotomicrografias de testículos de camundongos tratados com EATF300mg/kg de peso corporal. Em A observa-se a perda de células adluminais, deixando o lúmen (L) com aspecto aumentado, histopatologia classificada como de nível 4. Em B, C e F as setas indicam túbulos contendo vacúolos. Em C, D, E e F os asteriscos indicam túbulos com descamação celular. Barras: 20µm. Coloração: HE.

Os percentuais de túbulos normais e com alguma patologia estão dispostos na Figura 8. O EATF300 apresentou redução de túbulos considerados normais decorrente do aumento de túbulos com patologias, se comparado aos demais grupos.



**Figura 8.** Proporção de túbulos seminíferos normais e patológicos de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF. EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.5 Morfometria Intertubular

Estão apresentados na Tabela 12, a proporção volumétrica, o volume de intertúbulo e o índice Leydigossomático. Esses três parâmetros analisados não foram influenciados pelos tratamentos.

**Tabela 12.** Proporção volumétrica (IT) e volume (VIT) de intertúbulo e índice Leydigossomático (ILS) de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
IT (%)	8,73±2,60 <sup>a</sup>	7,90±1,45 <sup>a</sup>	6,99 ±2,01 <sup>a</sup>	8,61±1,12 <sup>a</sup>
VIT (µL)	0,09±0,003 <sup>a</sup>	0,09±0,001 <sup>a</sup>	0,10±0,003 <sup>a</sup>	0,09±0,002 <sup>a</sup>
ILS (%)	0,15±0,005 <sup>a</sup>	0,19±0,003 <sup>a</sup>	0,20±0,006 <sup>a</sup>	0,16±0,004 <sup>a</sup>

Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ( $p \leq 0,05$ ).

A proporção volumétrica dos componentes intertubulares está mostrada na Tabela 13. Núcleo e citoplasma de Leydig, vaso sanguíneo, espaço linfático e macrófagos não diferiram do controle. Entretanto, houve aumento do percentual de célula de Leydig em EATF100 em relação ao grupo controle, enquanto a proporção volumétrica de tecido conjuntivo reduziu nos grupos EATF100, EATF200 e EATF300 em relação ao controle.

**Tabela 13.** Proporção volumétrica dos componentes intertubulares de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
NL (%)	12,32±2,47 <sup>a</sup>	16,53±4,19 <sup>a</sup>	15,87 ±3,71 <sup>a</sup>	11,72±1,50 <sup>a</sup>
CL (%)	66,20±8,56 <sup>a</sup>	73,87±6,05 <sup>a</sup>	69,84±6,52 <sup>a</sup>	64,83±6,38 <sup>a</sup>
Ley (%)	78,53±9,41 <sup>a</sup>	90,40±2,41 <sup>b</sup>	85,72±5,86 <sup>a</sup>	76,56±6,62 <sup>a</sup>
VS (%)	8,58±9,74 <sup>a</sup>	4,80±1,34 <sup>a</sup>	5,57±3,87 <sup>a</sup>	14,11±7,61 <sup>a</sup>
EL (%)	3,67±1,40 <sup>a</sup>	1,90±1,75 <sup>a</sup>	5,69±3,70 <sup>a</sup>	7,02±3,90 <sup>a</sup>
TC (%)	5,39±2,01 <sup>a</sup>	2,75±1,35 <sup>b</sup>	2,38±0,98 <sup>b</sup>	1,77±0,55 <sup>b</sup>
MAC(%)	3,81±3,64 <sup>a</sup>	1,44 ±2,87 <sup>a</sup>	0,62±0,49 <sup>a</sup>	0,52±0,40 <sup>a</sup>

NL = núcleo de Leydig; CL = citoplasma de Leydig; Ley = célula de Leydig; VS = vaso sanguíneo (VS); EL = espaço linfático (EL); TC = tecido conjuntivo; MAC = macrófago; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores de volume dos componentes do intertúbulo estão apresentados na Tabela 14. Os parâmetros analisados não foram influenciados pelo tratamento.

**Tabela 14.** Volumetria dos componentes intertubulares de testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
VNL (µL)	0,0011±0,0004 <sup>a</sup>	0,0016±0,0005 <sup>a</sup>	0,0015±0,0006 <sup>a</sup>	0,0011±0,0003 <sup>a</sup>
VCL (µL)	0,0058±0,0019 <sup>a</sup>	0,0073±0,0009 <sup>a</sup>	0,0069±0,0019 <sup>a</sup>	0,0061±0,0015 <sup>a</sup>
VVS (µL)	0,0009±0,0013 <sup>a</sup>	0,0004±0,0001 <sup>a</sup>	0,0005±0,0004 <sup>a</sup>	0,0012±0,0005 <sup>a</sup>
VEL (µL)	0,0003±0,0001 <sup>a</sup>	0,0001±0,0001 <sup>a</sup>	0,0006±0,0004 <sup>a</sup>	0,0007±0,0004 <sup>a</sup>
VTC (µL)	0,0005±0,0003 <sup>a</sup>	0,0002±0,0001 <sup>a</sup>	0,0002±0,0001 <sup>a</sup>	0,0001±7,6311 <sup>a</sup>
VMAC (µL)	0,00034±0,0003 <sup>a</sup>	0,00015±0,0002 <sup>a</sup>	0,00007±6,3040 <sup>a</sup>	0,00005±3,2918 <sup>a</sup>

VNL = volume de núcleo de Leydig; VCL = volume de citoplasma de Leydig; VVS = volume de vaso sanguíneo; VEL = volume de espaço linfático; VTC = volume de tecido conjuntivo; VMAC = volume de macrófago; EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ( $p \leq 0,05$ ).

Diâmetro nuclear de Leydig, volume nuclear, citoplasmático e de Leydig estão expostos na Tabela 15. Os parâmetros analisados não foram influenciados pelos tratamentos.

**Tabela 15.** Diâmetro nuclear de Leydig (DN), volume nuclear de Leydig (VNL), volume citoplasmático de Leydig (VCL) e volume da célula de Leydig (VL) de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
DN ( $\mu\text{m}$ )	6,46 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	7,23 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	6,48 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	6,53 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
VNL ( $\mu\text{m}^3$ )	146,19 $\pm$ 54,41 <sup>a</sup>	201,21 $\pm$ 44,72 <sup>a</sup>	149,81 $\pm$ 68,17 <sup>a</sup>	145,84 $\pm$ 5,49 <sup>a</sup>
VCL ( $\mu\text{m}^3$ )	796,69 $\pm$ 283,95 <sup>a</sup>	933,66 $\pm$ 297,49 <sup>a</sup>	670,91 $\pm$ 240,16 <sup>a</sup>	814,31 $\pm$ 115,63 <sup>a</sup>
VL ( $\mu\text{m}^3$ )	942,88 $\pm$ 321,01 <sup>a</sup>	1134,90 $\pm$ 308,75 <sup>a</sup>	820,72 $\pm$ 293,33 <sup>a</sup>	960,15 $\pm$ 113,75 <sup>a</sup>

EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ( $p \leq 0,05$ ).

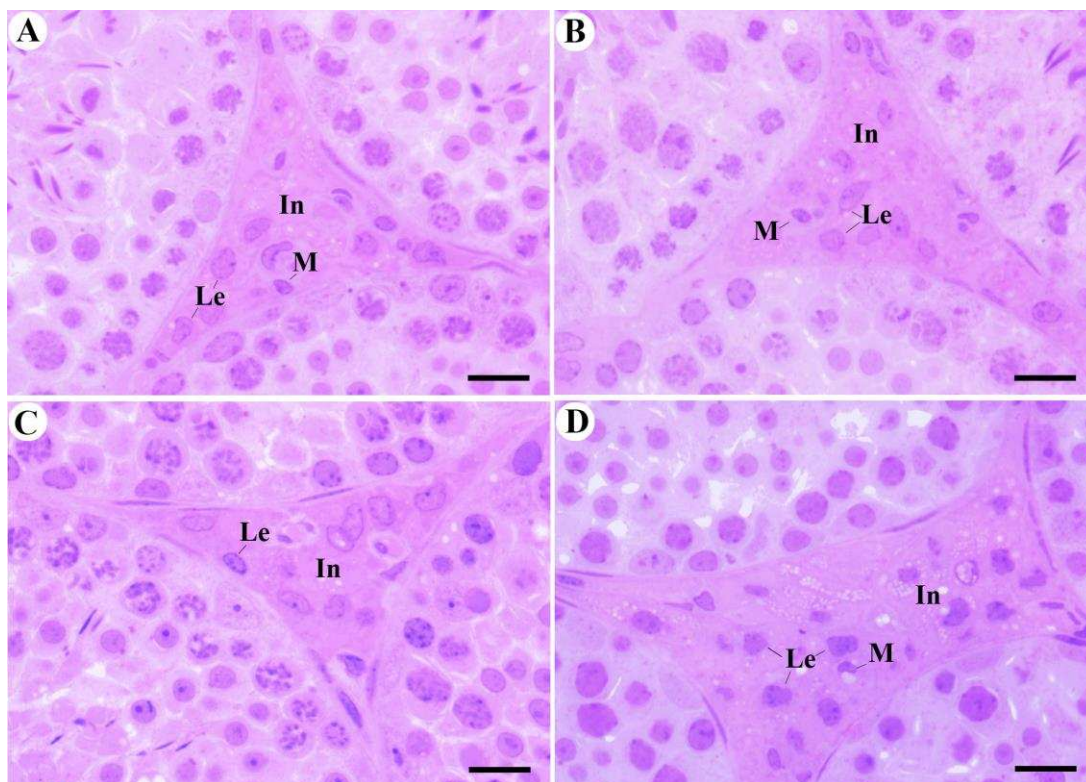
O volume e o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo estão apresentados na Tabela 16. Não foram observadas alterações nestes parâmetros com os tratamentos utilizados.

**Tabela 16.** Volume de células de Leydig por testículo (VLT) e por grama de testículo (VL/gT), número de células de Leydig por testículo (NL) e por grama de testículo (NL/gT) de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF.

Parâmetros	Controle	EATF100	EATF200	EATF300
VL/T ( $\mu\text{L}$ )	0,003 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	,004 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,004 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,003 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>
VL/gT ( $\mu\text{L}$ )	0,029 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,027 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,029 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,031 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>
NL/T*10 <sup>6</sup>	3,89 $\pm$ 1,42 <sup>a</sup>	4,14 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	5,46 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	3,80 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>
NL/gT*10 <sup>6</sup>	33,25 $\pm$ 11,42 <sup>a</sup>	25,67 $\pm$ 6,25 <sup>a</sup>	37, 64 $\pm$ 9,19 <sup>a</sup>	33,58 $\pm$ 8,74 <sup>a</sup>

EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Dados expressos como média $\pm$ DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ( $p \leq 0,05$ ).

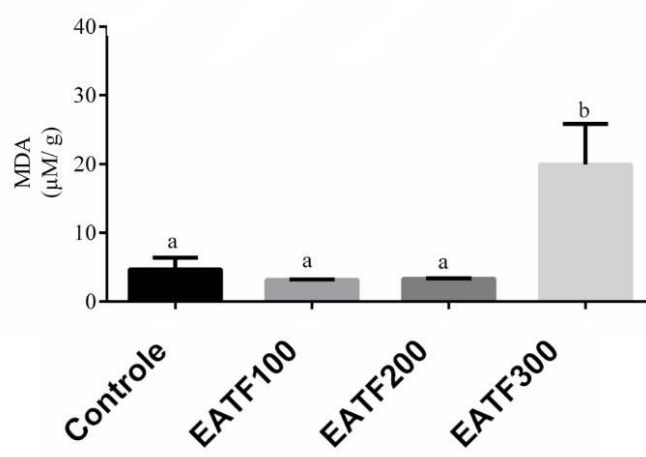
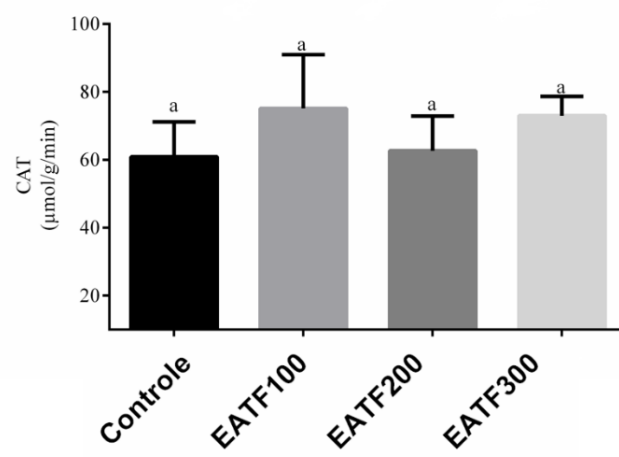
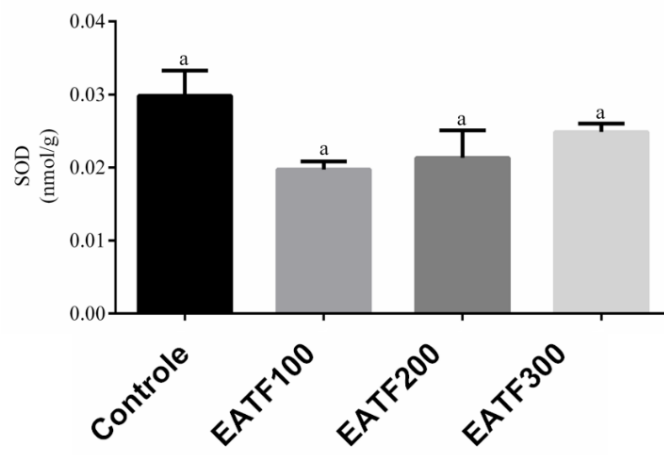
Também não foram observadas alterações morfológicas nos componentes intertubulares (Figuras 8A, B, C e D), em todos os tratamentos.



**Figura 9.** Fotomicrografias da região intertubular de testículos de camundongos Swiss. Grupo controle (A) e grupos tratados com 100, 200 e 300 mg/kg de extrato alcoólico de *T. fasciculatus* (B, C e D, respectivamente). Nota-se a integridade da região de intertúbulo (In) e alguns componentes de região como, células de Leydig (Le), macrófagos (M) e vasos sanguíneos (Vs). Barras: 10µm. Coloração: HE.

### 5.8 Atividade das Enzimas Antioxidantes e Determinação de Malondialdeído (MDA)

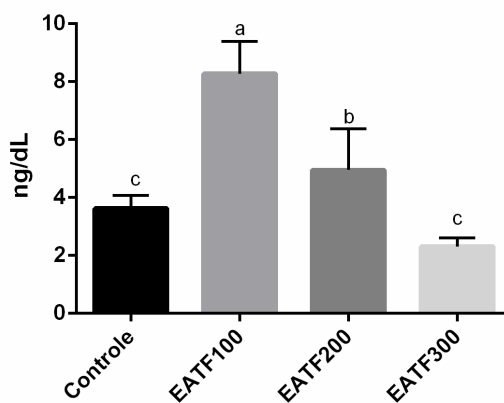
Os resultados da atividade das enzimas antioxidantes estão dispostos na Figura 10. Não houve alteração na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) entre os animais dos grupos tratados e controle. O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica aumentou no grupo EATF300 em relação aos outros grupos.



**Figura 10.** Atividade das enzimas antioxidantes em testículo de camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF. SOD = Superóxido Dismutase, CAT = Catalase, MDA = Malondialdeído. EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7 Testosterona sérica

Houve aumento na testosterona sérica nos tratamentos EATF100 e EATF200, quando comparados ao grupo controle (Figura 11), no entanto os níveis foram maiores no EATF100 em relação a EATF200.



**Figura 11.** Concentração de testosterona sérica em camundongos Swiss adultos expostos a diferentes concentrações de EATF. EATF = extrato alcoólico de *T. fasciculatus* nas concentrações 100, 200 e 300mg/kg. Letras diferentes nas colunas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Para a espécie *Tynanthus fasciculatus*, são restritas as informações disponíveis em relação à prospecção fitoquímica dos extratos vegetais. A análise fitoquímica preliminar realizada neste trabalho mostrou a presença de cumarinas, taninos, saponinas, esteroides e flavonoides no caule de *T. fasciculatus*. A presença destes grupos de metabólitos secundários foram confirmadas pela literatura como compostos presentes em diversas espécies deste gênero. Vilegas (1993) demonstrou a presença de cumarina, fenilpropanoides e esteroides ( $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucoside). Vilegas et al. (1994) demonstraram a presença de cumarinas em todas as partes da planta e cumarina, ácido meliótico e estigmasterol no extrato hexânico de raízes de *T. fasciculatus*. De acordo com Carvalho et al. (2009), *T. fasciculatus* ainda contém flavonoides, heterosídeos cardiotônicos e taninos. Esta variação nos resultados quanto à presença de grupos de metabólitos secundários pode ser relacionada com os diversos fatores que interferem na quantidade e até mesmo na natureza dos constituintes ativos. Os fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários pelas espécies vegetais são: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macromoléculas e micromoléculas), poluição atmosférica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2010).

O extrato alcoólico de *T. fasciculatus* (EATF) não promoveu diferenças na massa corporal em camundongos. Resultados semelhantes foram observados em ratos Wistar expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de *T. fasciculatus* (MELO et al., 2010) e com extrato aquoso de *Arctium lappa* (PREDES et al. 2007). Por outro lado, ratos que receberam extrato de espécies vegetais também consideradas afrodisíacas, como extrato aquoso de *Lepidium meyenii* (Maca) (GASCO et al., 2007) e extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata* (MATTA, 2012), obtiveram ganho de massa corporal.

Segundo Mangelsdorf et al. (2003), a avaliação do peso dos órgãos reprodutores é um dos parâmetros mais sensíveis para a detectar a influência de uma substância sobre o sistema reprodutor masculino. Neste trabalho, observou-se aumento no peso testicular em EATF100 e EATF200, e conforme França e Russell (1998), esse aumento está relacionado às alterações nos componentes do parênquima testicular, refletindo na porção produtiva gametogênica do testículo. De acordo com

Russell et al. (1990a) e França e Russell (1998), o aumento da massa testicular pode ser utilizado como indicativo do aumento da produção espermática.

Os túbulos seminíferos são os principais componentes testiculares analisados em pesquisas envolvendo parâmetros reprodutivos masculinos e a medida do diâmetro tubular, altura e volume do epitélio constituem uma abordagem utilizada como indicador da atividade espermatogênica (FRANÇA; RUSSELL, 1998; PAULA et al., 2002). Os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) aumentaram nos animais tratados com EATF100 e EATF200, refletindo investimento na produção espermática, pois esses parâmetros estão relacionados com a função espermatogênica do testículo. De modo similar, Melo et al. (2010) demonstraram aumento no ITS em animais que receberam extrato aquoso de *T. fasciculatus*, embora os mesmos não tenham apresentado alterações no IGS. Por outro lado, camundongos tratados com extrato hidroalcoólico de *P. glomerata* apresentaram redução no IGS em relação ao controle, refletindo a ação tóxica nas dosagens de 300mg e 400mg utilizadas (MATTA, 2012). Ratos Wistar tratados com *Ginkgo biloba* nas doses de 3,5mg/Kg, 7mg/Kg e 14mg/Kg, não mostraram alterações em IGS e ITS (OSHIO et al., 2015). Neste trabalho observou-se ainda, aumento de volume de epitélio seminífero (ES) e tubular (TS), além do aumento do comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (CTS/T) nos grupos EATF100 e EATF200, o que pode reforçar um ganho no processo espermatogênico. Como mostrado por Gomes et al. (2011), animais tratados com infusão de *Heteropterys aphrodisiaca*, também não alteraram a altura do epitélio e o percentual de túbulo seminífero, embora tenham mostrado redução do diâmetro de túbulo seminífero.

Conforme Clermont (1972) e França (1991), a quantificação da população dos diferentes tipos de células germinativas e de células de Sertoli, por secção transversal de túbulos seminíferos nos diversos estádios do ciclo, permite avaliar funcionalmente o processo espermatogênico e estimar a produção espermática, além de propiciar conhecimento da cinética da espermatogênese. No presente estudo, os animais tratados com EATF100, apresentaram aumentos no número de espermátocitos primários em preleptóteno, paquíteno e espermátides arredondadas, e o grupo EATF200 aumento nas espermátides arredondadas. Apesar do número de espermatogônias não ter sido diferente estatisticamente, o grupo EATF100 apresentou maior quantidade dessas células comparado aos outros grupos. Como as

espermatogônias proliferam em progressão geométrica, houve aumento significativo das outras células germinativas resultantes dessas divisões, como preleptótenos, paquítenos e espermátides arredondadas (CHIARINI-GARCIA; RUSSELL, 2002). Adicionalmente, e pelo mesmo motivo, houve aumento das espermátides arredondadas no grupo EATF200. Esse aumento no número corrigido de células refletiu em aumento na taxa de produção espermática diária (PED) nos animais tratados com EATF100 e EATF200.

Os animais tratados com EATF300 apresentaram alterações morfológicas na região tubular, demonstrando ser esta uma dosagem de baixa eficácia e não muito segura. A exposição a essa concentração promoveu perturbações na região tubular, o que foi evidenciado pela presença de vacúolos e descamação do epitélio seminífero, possivelmente ocasionado pelo funcionamento anormal das células de Sertoli. Tal fato foi demonstrado pela redução da capacidade de suporte total (CST) e a eficiência das células Sertoli, o que afetou a integridade de células germinativas adluminais, levando a uma baixa PED. Segundo França e Russell (1998) e Hess e França (2005), a capacidade total de suporte da célula de Sertoli (número de células germinativas suportadas por uma célula de Sertoli), assim como seu índice (razão espermátide: célula de Sertoli) são os melhores reflexos da eficiência funcional dessa célula, além de serem parâmetros altamente correlacionados com a produção espermática. As células de Sertoli são capazes de detectar anormalidades qualitativas nas células germinativas, podendo fagocitá-las, eliminando células defeituosas (YIN et al., 2017). Conforme estes autores, sob condições fisiológicas e fisiopatológicas, tais como a exposição a produtos químicos, radiações e inanição, a autofagia é ativada em células de Sertoli ou espermatogênicas. Esse evento é ativado por mecanismos moleculares ainda desconhecidos (OZTURK et al., 2017), e cuja finalidade é manter a sobrevivência das células espermatogênicas, através da inibição da apoptose celular espermatogênica. Além de manter a integridade das especializações ectoplasmáticas (ES) por degradação da PDZ e LIM domínio 1 (PDLIM1), um regulador negativo da organização do citoesqueleto. Contudo, o acúmulo de PDLIM1 resulta na desorganização do citoesqueleto das células de Sertoli, culminando em autofagia deficiente e interrupção das especializações ectoplasmáticas e comunicação entre células de Sertoli e germinativas, promovendo a desorganização dos túbulos seminíferos (LIU et al., 2016). O dano das células de Sertoli é frequentemente reconhecido por vacúolos inter ou intracelulares ou pelo inchaço do citoplasma basal

dessas células. Assim, distúrbios na função celular de Sertoli alteram o suporte estrutural ou metabólico das células germinativas (CREASY, 2001). Possivelmente estes eventos tenham ocasionado essas perturbações no microambiente, ocasionando alterações morfológicas nos túbulos seminíferos dos animais do grupo que recebeu EATF300.

O compartimento intertubular apresentou aumento na proporção volumétrica de célula de Leydig nos animais tratados com EATF100 e aumento nos níveis séricos de testosterona no EATF100 e EATF200 em relação ao controle. Estudos realizados por Yakubu e Akanji (2011) demonstraram ganho na produção de andrógenos em ratos tratados com extrato aquoso de *Massularia acuminata* nas dosagens de 500mg/kg e 1000mg/kg. Segundo esses autores, esse ganho na produção de andrógenos ocorreu devido a presença de fitoquímicos como flavonoides e saponinas no extrato administrado. A prospecção fitoquímica de EATF demonstrou a presença desses metabólitos secundários. Conforme Alok et al. (2013), as saponinas esteroidais atuam promovendo o ganho de andrógenos de várias maneiras, tais como, aumentando os níveis de LH e FSH produzidos pela adenohipófise, e se ligando a enzimas envolvidas na produção de andrógenos. Ainda segundo esses autores, os flavonoides atuam aumentando os níveis de deidroepiandrosterona (DHEA), precursora de testosterona. Isso sugere que o aumento na produção de testosterona, nos grupos EATF100 e EATF200, se deu devido à presença de flavonoides e saponinas esteroidais em *T. fasciculatus*.

Os demais parâmetros morfométricos avaliados para região intertubular não apresentaram diferenças significativas entre animais tratados e animais do grupo controle. Esses resultados demonstram que não houve interferência das diferentes concentrações de EATF para os demais parâmetros nessa região testicular.

A determinação das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) não demonstraram diferenças entre os grupos. Contudo, foi observado aumento de malondialdeído (MDA) nos animais tratados com EATF300 em relação aos demais grupos. Conforme Halliwell e Chirico (1993), a determinação do MDA tem atraído interesse por oferecer um meio de avaliar a peroxidação lipídica em membranas biológicas. O aumento de MDA ratifica as alterações morfológicas tubulares neste grupo como comentado anteriormente. Possivelmente, em algum momento SOD e CAT atuaram, mas não foram efetivas o suficiente para proteger as células testiculares contra a formação de ROS, ocasionando a peroxidação lipídica no

grupo EATF300. As enzimas SOD e CAT convertem enzimaticamente o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (DROGE, 2002), enquanto a CAT é responsável pela decomposição de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (AEBI, 1984). O estresse oxidativo surge quando as células não conseguem destruir adequadamente o excesso de radicais livres formados, resultando no desequilíbrio entre formação e neutralização de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (ROS/RNS). Esses radicais livres em excesso podem danificar as membranas celulares e as lipoproteínas por um processo chamado peroxidação lipídica. Possivelmente, a peroxidação lipídica nas células testiculares, marcadas pelo aumento de MDA, esteja relacionada com o excesso de metabólitos secundários no EATF 300, o que pode ter sido responsável pelas alterações qualiquantitativas observadas. Diante de tal situação, é preciso salientar que, as saponinas, taninos, flavonoides e alcaloides são os principais responsáveis pelos efeitos tóxicos das plantas (CANSIAN 2014), sendo os três primeiros metabólitos encontrados no extrato de *T. fasciculatus*.

Além do mais, é oportuno frisar que os flavonoides e ácidos fenólicos estão recebendo maior atenção devido ao potencial antioxidante, principalmente devido à sua ampla presença em um grande número de alimentos consumidos. Contudo, os antioxidantes exógenos, incluindo polifenóis, foram considerados “faca de dois gumes” no estado redox celular, pois, vários estudos mostraram resultados controversos, especialmente quando administrados em doses elevadas, podendo torná-los pró-oxidantes e, nesses casos, interferirem negativamente no ambiente celular (YORDI et al., 2012). Porém, quando administrados em doses fisiológicas (nutricionais), desempenham papel importante na manutenção ou restabelecimento da homeostase redox, um estado essencial na manutenção de sistemas biológicos saudáveis (BOUAYED; BOHN, 2010). Diante disso, nossos resultados sugerem que na dosagem EATF300, os flavonoides, podem ter atuado como pró-oxidante, desencadeando um desequilíbrio no estado redox celular, culminando no aumento de MDA.

## 7. CONCLUSÕES

Concluimos que o tratamento com extrato alcoólico do cipó-cravo, *T. fasciculatus*, nas doses de 100 e 200mg, promoveu aumento significativo nos níveis séricos de testosterona, peso testicular e nos parâmetros tubulares, especialmente aqueles relacionados ao epitélio seminífero, aumentando a produção espermática. A dosagem de 300mg promoveu peroxidação lipídica e aumento no percentual de patologias tubulares sem, no entanto, comprometer a produção espermática durante o período de tratamento. O uso prolongado do produto em altas dosagens pode levar à diminuição da produção, uma vez que houve danos às membranas plasmáticas.

Desta forma, este trabalho contribuiu para demonstrar o potencial de *Tynanthus fasciculatus*, corroborando as evidências para sua indicação como planta afrodisíaca, conforme sua utilização pela população, embora com certo cuidado nas dosagens, assim como outras espécies do gênero *Tynanthus*.

## 8. REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, M. . Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Records*. v. 94, p. 238 - 248, 1946.

ADAM-VIZI, V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants e Redox Signaling*. v. 7, p. 1140 - 1149, 2005.

ADAM-VIZI, V.; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 27, p. 639 - 645, 2006.

ADIMOELJA, A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. *International Journal of Andrology*. v. 23, p. 82 - 84, 2000.

AEBI, H. Oxygen radicals in biological systems. *Methods in Enzymology*. v. 105, n. 1947, p. 121 - 126, 1984.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC nº 105, de 31 de agosto de 2016. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial União*. 1º de setembro de 2016.

AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 1, n.1, p. 15 - 24, 2008.

ALOK, S.; RATENDRA, K; RAMANDEEP, S. Nature's Aphrodisiacs - A Review of Current Scientific Literature. *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research*. v. 3, n. 2, p. 1 - 20, 2013.

AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*. v. 57, p. 380 - 403, 1983.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*. v. 45, p. 774 - 781, 1962.

AMANN, R. P. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertility and Sterility*. v. 21, p. 662 - 672, 1970.

AMORIM, A.; BORBA, H. R.; AMANO, L. M. Ação anti-helmíntica de plantas IV. Influência da casca do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers; Bignoniaceae) na eliminação de *Vampirolepis nana* e de oxiurídeos em camundongos. *Revista Brasileira de Farmácia*. v. 72, p. 92 - 94, 1991.

ATTAL, J.; COURT, M. . Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. v. 3, p. 219 - 241, 1963.

BAHMANPOUR, S.; VOJDANI, Z.; PANJEHSHAHIN, M. R.; HOBALLAH, H.; KASSAS, H. Effects of *Carthamus tinctorius* on semen quality and gonadal hormone levels in partially sterile male rats. *Korean Journal of Urology*. v. 53, n. 10, p. 705 - 710, 2012.

BARAKAT, B.; ITMAN, C.; MENDIS, S. H.; LOVELAND, K. L. Activins and inhibins in mammalian testis development: New models, new insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 359, p. 66 - 77, 2012.

BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences Nutrition*. V. 47, n.3, p. 233 - 261, 1996.

BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: A review. *Journal of Animal Science*. v. 44, p. 817 - 833, 1977.

BOEKELHEIDE, K. . Sertoli Cell Toxicants. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M. D. (Ed.). *Sertoli Cell Biology*. San Diego: Elsevier, p. 345 - 382, 2005.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants - double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 3, n. 4, p. 228 - 237, 2010.

BRACK, E. A. Diccionario enciclopédico de plantas utiles del Perú. Cusco: Centro de Estudios Regionales, Andinos Bartolomé de las Casas, p.508 - 509, 1999.

BROOKES, P. S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J. L, ANDERS, M. W.; SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology*. v. 287, p. 817 - 833, 2004.

BUREAU, M. E. Revisión des genres *Tynanthus* et *Lundia*. *Adansonia* (Baillon). *Recueil Périodique D'observations Botaniques*. v. 8, p. 270 - 294, 1868.

CAMELLO-ALMARAZ, C.; GOMEZ-PINILLA, P. J.; POZO, M. J.; CAMELLO, P. J. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *American Journal of Physiology*. v. 291, p. 1082 - 1088, 2006.

CANSIAN, F.C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; MIYASAKI, C.M.S.; LIMA, C.P.; KALEGARI, M.; MERINO, F.J.Z.; SOUZA, A.M.; COGO, L.L. Phytochemical, toxicity and microbiological activity study of *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex Schum. (Bignoniaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*. v.31, n.3, p.487 - 4 91, 2012.

CANSIAN, F.C.; LIMA, C.P.; ZORTÉA, F.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Potencial alelopático de *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex. Schum. (Bignoniaceae) sobre diásporos de *Lactuca sativa* L. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 34, n. 4, p.137 - 140, 2013.

CANSIAN, F. C. ABORDAGEM FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Tynanthus micranthus* CORR. MELLO EX SCHUM. (BIGNONIACEAE). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, p.121, 2014.

CANSIAN, F.C.; SILVA, C.B.; LIMA, C.P.; MERINO, F.J.Z.; RECH, K.S.; OTUKI, M.F.; CAMPOS, P.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. *Tynanthus micranthus*: an efficient antioxidant and tyrosinase activity inductor. African Journal Pharmacy Pharmacology. v. 8, n. 23, p. 651 - 657, 2014a.

CANSIAN, F. C.; MERINO, F. J. Z.; AMARAL, V. L. L.; SALVADOR, R. A.; CAMPOS, P. M.; MONTRUCCHIO, D.P.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Aphrodisiac properties of *Tynanthus micranthus* Corr. & Mello ex.Schum in male mice. African Journal of Pharmacy Pharmacology. v. 8, n. 47, p.1200 - 1204, 2014b.

CARVALHO, C. A.; MATTA, S. L. P.; MELLO, F.C.S. A.; ANDRADE, D. C.F.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; SILVA, M. B.; ROSA, M. B. Cipó-cravo (*Tynanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. Revista Eletrônica de Farmácia. v. 6, n. 1, p. 51 - 57, 2009.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. v. 38, p. 1482 - 1495, 2006.

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*. v. 157, p. 1 - 11, 2009.

CHATURAPANICH, G.; S CHAIYAKUL, S.; V VERAWATNAPAKUL, V.; PHOLPRAMOOL, C. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatic blood flow in male rats. *Reproduction*. v. 136, n. 4, p. 515 - 522, 2008.

CHAUHAN, N. S.; SHARMA, V.; DIXIT, V. K. Effect of *Asteracantha longifolia* seeds on the sexual behaviour of male rats. *Natural Product Research*. v. 25, n. 15, p. 1423 - 1431, 2011.

CHENG, C.Y.; MRUK, D. D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*. v. 64, p. 16 - 64, 2012.

CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L. D. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction*. v. 123, p. 567 - 577, 2002.

CHIARINI-GARCIA, H.; PARREIRA, G.G.; ALMEIDA, F.R. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. *Methods in Molecular Biology*. v. 689, p. 3 - 18, 2011.

CICERO, A. F. G.; BANDIERI, E.; ARLETTI, R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 75, n. 2, p. 225 - 229, 2001.

CICERO, A. F. G.; PIACENTE, S.; PLAZA, A.; SALA, E.; ARLETTI, R.; PIZZA, C. Hexanic Maca extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic Maca extracts. *Andrologia*. v. 34, p. 177 - 179, 2002.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*. v. 52, n. 1, p. 198 - 236, 1972.

COOKE, B. A. Transduction of the luteinizing hormone signal within the Leydig cell. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (Ed.). *The Leydig Cell*. Vienna: Cache River Press. p. 352 - 363, 1996.

CORREA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 1.ed. Rio de Janeiro: IBDF. p. 687, 1974.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDENMARK, N. L. (Ed.). *The testis*. New York: Academic Press. p. 339 - 432, 1970.

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

CURTIS, S. K.; AMANN, R. P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in *Holstein bulls*. *Animal Science Journal*. v. 53, p. 1645 - 1657, 1981.

CUSTÓDIO, D. L.; BURGO, R. P.; MORIEL, B.; BARBOSA, A. M.; REZENDE, M.I.; DANIEL, J. F. S.; PINTO, J. P.; BIANCHINI, E.; FARIA, T. J. Antimicrobial activity of essential oils from *Piment pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 53, n. 6, p.1363 - 1369, 2010.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HESENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart : increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*. v. 101, n. 1, p. 33 - 39, 2000.

DONG, S. H.; CAI, G.; NAPOLITANO, J. G.; NIKOLIC, D.; LANKIN, D. C.; MCALPINE, J. B.; VAN BREEMEN, R. B.; SOERJARTO, D. D.; PAULI, G. F.; CHEN, S. N. Lipidated steroid saponins from *Dioscorea villosa* (wild yam). *Fitoterapia*. v. 91, p. 113 - 124, 2013.

DOORN, J. A.; PETERSEN, D. R. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chemico-Biological Interactions*.v. 143, p. 93 - 100, 2003.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monatsh Veterinarmed*, v. 29, p. 650 - 652, 1974.

DOUGHAN, A. K.; DIKALOV, S. I. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide production and cellular apoptosis. *Antioxidants e Redox Signaling*. v. 9, p. 1825 - 1836, 2007.

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

DUARTE, J.; VIZCAÍNO, F. P.; UTRILLA, P.; JIMÉNEZ, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. structure–activity relationships. *General Pharmacology*. v. 24, p.857 - 862, 1993.

ELFERINK, J. G. R. Aphrodisiac Use in Pre-Columbian Aztec and Inca Cultures. *Journal of the History of Sexuality*. v. 9, n. 1/2, p. 25 - 36, 2000.

EDENHARDDER, R.; PETERSDORFF, I.; RAUSCHER, R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline (IQ) and heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. v. 287, p.261 - 74, 1993.

FALLAHI, S.; RAJAEI, M.; MALEKZADEH, K.; KALANTAR, S. M. Would *Phoenix dactyflera* Pollen (palm seed) be considered as a treatment agent against males infertility? A systematic review. *Electronic Physician Journal*. v. 7, n. 8, p. 1590 - 1596, 2015.

FAN, X.; ROBAIRE, B. . Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*. v. 139, p. 2128 - 2136, 1998.

FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 1.ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, p.1149, 1929.

FAWCETT, DON W; NEAVES, WILLIAN B; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*. v. 9, n. 5, p. 500 - 532, 1973.

FATO, R.; BERGAMINI, C.; LEONI, S.; STROCCHI, P.; LENZA, G. Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration. *Neurochemical Research*. v. 3, p. 2487 - 2501, 2008.

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.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Actions*. v. 32, p. 283 - 288, 1991.

FERRIER, J.; CARTER-RAMIREZ, A.; PESEK, T.; CAL, V.; BALICK, M.J.; ARNASON, J.T. K'an. *Tynanthus guatemalensis* Donn. Sm.: the taxonomic and archeological mystery behind a maya antidiabetic medicinal plant (Invited). In: *Natural Health Product Research Society of Canada*, 2013. Ontario, 2013. Available at: <<https://www.mendeley.com/research/kan-tynanthus-guatemalensisdonnsm-taxonomic-archeological-mystery-behind-mayaantidiabetic-medicina>>. Acesso em 15 abril 2016.

FERRIER, J. Ethnobotany, pharmacology, and metabolomics of antidiabetic plants used by the Eeyou Istchee Cree, Lukomir Highlanders, and Q'eqchi' Maya. Dissertation of master degree. Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies. University of Ottawa, p. 193, 2014.

FOUCHE, G.; AFOLAYAN, A.; WINTOLA, O. A.; KHOROMBIL, T. E.; SENABE, J. Effect of the aqueous extract of the aerial parts of *Monsonia angustifolia* E. Mey. Ex A. Rich., on the sexual behaviour of male Wistar rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. v. 15, p. 1 - 10, 2015.

FRANÇA, L. R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça piau. Tese (Doutorado em Morfologia) Belo Horizonte-MG, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais UFMG, p.185, 1991.

FRANÇA, L. R.; PARREIRA, G. G; GATES, J.; RUSSEL, L. Kinetics of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: Quantitation and Effect of Elimination of Residual. Journal of Andrology. v. 19, n. 3, p. 335 - 340, 1998.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). Male reproduction - a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications, p. 198 - 219, 1998.

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.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. v. 2012, p. 11, 2012.

GASCO, M.; AGUILAR, J.; GONZALES, G. F. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. Andrologia. v. 39, n. 4, p. 151 - 158, 2007.

GE, R. S.; SHAN, L. X.; HARDY, M. P. Pubertal development of Leydig cells. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (Ed.). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, p. 159 - 173, 1996.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae. Part I (Crescentieae and Tourrettieae). New York: The New York Botanical Garden, Flora Neotropica, v. 25, 1980.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova. v. 30, n. 2, p. 374 - 381, 2007.

GODINHO, C. L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, p. 80, 1999.

GODIC, A.; POLJAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. v. 2014, p. 6, 2014.

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

GRISWOLD, M. D. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: GRISWOLD, M. RUSSELL, L. D. (Ed.) The Sertoli Cell. Clearwater, FL, Cache River Press, p.493 - 508, 1993.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*. v. 186, p. 1 - 85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. v. 59, p. 1.609 - 1.623, 1992.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v.57, p. 715 - 724, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK, 3. ed, 1999.

HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; SMITH, C. E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*. v. 73, n. 4, p. 241 - 278, 2010.

HESS, R.A.; FRANÇA, L. R. . Structure of the Sertoli Cell. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M. P. (Ed.). *Sertoli Cell Biology*. San Diego: Elsevier, p. 19 - 40, 2005.

HESS, R. A.; VOGL, A. W. Sertoli cell anatomy and cytoskeleton. In: GRISWOLD, M (Ed.). *Sertoli Cell Biology*. Oxford: Elsevier Academic Press, p. 1 - 55, 2015.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; LINCOLN, G. A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 54, p. 209 - 213, 1978.

HOLDCRAFT, R. W.; BRAUM, R. E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology*. v. 27, p. 335 - 342, 2004.

HU, C.C.; LIN, J. T.; LIU, S. C.; YANG, D. J. A spirostanol glycoside from Wild Yam (*Dioscorea villosa*) extract and its cytostatic activity on three cancer cells. *Journal of Food and Drug Analysis*. v. 15, n. 3, p. 310 - 315, 2007.

ILODIGWE, E. E.; IGBOKWE, E.N.; AJAGHAKU, D. L.; IHEKWEREME, C.P. Aphrodisiac Activity of Ethanol Root Extract and Fractions of *Landolphia dulcis* (Sabine) Pichon. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*. v. 4, n. 2, p. 813 - 818, 2013.

IPLANTS. Disponível em: <<http://apps.kew.org/wcsp/qsearch.do>>. Acesso em: 10 out. 2016.

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

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

JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. 7. ed. São Paulo: Nacional, 1985.

KO, W.C.; SHIH, C. M.; LAI, Y. H.; CHEN, J.H.; HUANG, H.L. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*. v. 15, p. 2087 - 2094, 2004.

KONG, J.; GOH, N.; CHIA, L.; CHIA, T. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta pharmacologica Sinica*. v. 24, n. 1, p. 7 - 21, 2003.

KOOPMAN, W. J.; NIJTMANS, L. G.; DIETEREN, C. E.; ROESTENBERG, P.; VALSECCHI, F.; SMEITINK, J. A.; WILLEMS, P. H. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants and Redox Signaling*. v. 12, n. 12, p. 1431 - 1470, 2010.

LEITE, J. P. V. Fitoterapia. Bases científicas e tecnológicas. Ed. Atheneu. 328p, 2009.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Annals of the New York Academy of Sciences. v. 55, p. 548 - 573, 1952.

LIU, C.; WANGA, H.; SHANGA, Y.; LIU, W.; SONGA, Z.; ZHAO, H, WANGA,L.; JIAC, P.; GAO, F.; XU, Z.; YANG, L.; GAO, F.; LIA, W. Autophagy is required for ectoplasmic specialization assembly in sertoli cells. Autophagy. v. 12, n. 5, p. 814 - 832, 2016.

LOHMANN, L.G.; ULLOA, C.U. Bignoniaceae. In iPlants prototype checklist [online], 2007. Disponível em: <http://www.iplants.org>. Acesso em: 20 nov. 2016.

LUKE, M. C.; COFFEY, D. S. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: KNOBIL, E. (Ed). The physiology of reproduction. New York: Raven Press, p. 1435 - 1488, 1994.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA , V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quimica Nova. v. 25, n. 3, p. 429 - 438, 2002.

MANGELSDORF, I.; BUSCHMANN, J.; ORTHEN, B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemical on male fertility. Regulatory Toxicology and Pharmacology. v. 37, p. 356 - 369, 2003.

MALVIYA, N.; JAIN, S.; GUPTA, V. B.; VYAS, S. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction - A review. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research v. 68, n. 1, p. 3 - 8, 2011.

MATTA, A. P. D. L. F. Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos adulto. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, p. 103, 2012.

MELNYK, J. P.; MARCONE, M. F. Aphrodisiacs from plant and animal sources - A review of current scientific literature. *Food Research International*. v. 44, n. 4, p. 840 - 850, 2011.

MELO, F. C. S. A.; MATTA, S. L. P.; PAULA, T. A. R.; GOMES, M. L. M.; OLIVEIRA, L. C. The effects of *Tynanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*. v. 43, n. 4, p. 445 - 450, 2010.

MEINHARDT, A.; HEDGER, M. P. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 335, p. 60 - 68, 2011.

MENDES, F. R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 21, n. 4, p. 754 - 763, 2011.

MENON, L. G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Letters*. v. 95, p. 221 - 225, 1995.

MIERS, J. Report on the plants collected by Mr. Weir, especially the Bignoniaceae. *Proceedings of the Royal Horticultural Society of London*. v. 3, p.193, 1863.

MIRANDA-CRUZ, E.; CENTURIÓN-HIDALGO, D.; VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ, J.R.; ALOR-CHÁVEZ, M.J. Antimicrobial activity of *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. and *Spondias purpurea* L. extracts. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* v. 11, n.4, p.354 - 361, 2012.

MORALES, L.; ACERO, N.; GALÁN, A.; PÉREZ-GARCIA, C.; ALGUACIL, L.F.; MUÑOZ-MINGARRO, D. Bioactive properties of *Tynanthus panurensis* (Bureau) Sanwith bark extract, the Amazonian “clavo huasca”. *Journal of Medicinal Food*, v.14, n.9, p. 939 - 943, 2011.

MRUK, D. D.; SILVESTRINI, B.; MO, M. Y.; CHENG, C. Y. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*. v. 65, n. 4, p. 305 - 311, 2002.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; ROJAS, I.; VARGAS, L.; TAE, A.; DEHARO, E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 69, n.2, p.139 - 155, 2000.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A<sub>2</sub>s and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1488, p. 167 - 181, 2000.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G., MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterapicos no Brasil. *Visão Acadêmica*. v. 7, n. 2, 2006.

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

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H.; CUPPS, P. T. (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. New York: Academic Press, p. 203 - 227, 1977.

OSHIO, L. T.; RIBEIRO, C. C. T.; MARQUES, R. M.; GUERRA, M. O.; MATTA, S. L. P.; REIS, J. E. P.; SILVEIRA E SA, R. C.; CAMPOS, L. V.; PETERS, V. M. Effect of *Ginkgo biloba* extract on sperm quality, serum testosterone concentration and histometric analysis of testes from adult Wistar rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 9, n. 5, p. 122 - 131, 2015.

OZTURK, N.; STEGER, K.; SCHAGDARSURENGIN, U. The impact of autophagy in spermiogenesis. *Asian Journal of Andrology*. v. 19, p. 1 - 2, 2017.

PANDE, M.; PATHAK, A. Effect of ethanolic extract of *Ocimum gratissimum* (Ram tulsi) on sexual behaviour in male mice. International Journal of PharmTech Research. v. 1, n. 3, p. 468 - 473, 2009.

PARK, W. S.; SHIN, D. Y.; KIM, D. R.; YANG, W. M.; CHANG, M. S.; PARK, S. K. Korean ginseng induces spermatogenesis in rats through the activation of cAMP-responsive element modulator (CREM). Fertility and Sterility. v. 88, n. 4, p. 1000 - 1002, 2007.

PATEL, D. K.; KUMAR, R.; PRASAD, S. K.; HEMALATHA, S. Pharmacologically screened aphrodisiac plant-A review of current scientific literature. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. v. 1, n. 1, p. 131 - 138, 2011.

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

PAYNE, A. H.; HARDY, M. P. The Leydig cell in health and disease. New Jersey: Humana Press, 2007.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. v. 2014, p. 11, 2014.

PLANT, T.M.; MARSHALL, G. R. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. Endocrine Reviews. v. 22, n. 6, p. 764 - 786, 2001.

PLAZA, A.; MONTORO, P.; BENAVIDES, A.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Phenylpropanoid glycosides from *Tynanthus panurensis*: characterization and LC-MS quantitative analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry., v.53, n.8, p.2853 - 2858, 2005.

POCCIA, D. Molecules of the somatic cells. In: POCCIA, D. (Ed.). Molecular biology intelligence unit; molecular aspects of spermatogenesis. Austin: R.G.Landes Company, p. 75 - 90, 1994.

POLJSAK , B.; MILISAV, I. The neglected significance of “antioxidative stress”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2012, p. 12, 2012.

PREDES, F. S.; MONTEIRO, J. C.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P. . Evaluation of rat testes treated with *Articum lappa* L: Morphometric Study. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*.v. 24, n. 2, p. 112 - 117, 2007.

QARAWI, A. A. Stimulatory effect of the aqueous extract of *Ruta chalepensis* on the sex organs and hormones of male rats. *The Journal of Applied Research*. v. 5, n.1, p 206 - 211, 2005

QUINTANA, P.G.; VARGAS, R.L. Guía popular de plantas utilizadas por los Mosestenes de Covendo, Santa Ana, y Muchanes. (Alto Beni, Bolivia). La Paz: Fonama, 1995. 186p. apud MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; ROJAS, I.; VARGAS, L.; TAE, A.; DEHARO, E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosestene Indians. *Journal Ethnopharmacology*. v.69, n.2, p.139-155, 2000.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signaling*. V. 24, n. 5, 2012.

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. 21, n. 3, p. 133 - 149, 2005.

RUSSELL, L. D. Sertoli-Germ Cell Interrelations: A review. *Gamete Research*. v. 3, p. 179 - 202, 1980.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian Spermatogenesis. In: RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A. ; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (Eds.). Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida: Cache River Press. p. 1 - 40, 1990a.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. *Tissue and Cell*. v. 27, p. 129 - 147, 1995.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E. D. Histopathology of the testis. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E. D. (Ed.). Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida: Cache River Press. p. 210 - 266b, 1990b.

SANDRONI, P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. *Clinical Autonomic Research : Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society*. v. 11, n. 5, p. 303 - 307, 2001.

SANDWITH; N.Y; HUNT, D.R. Bignoniaceas. Itajaí: Herbario Barbosa Rodrigues,. v.18. p.77, 1974.

SETCHELL, B. P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P. T. (Ed.). *Reproduction in Domestic Animals*. 4. ed. San Diego: Academic Press. p. 221 - 250, 1991.

SHAMLOUL, R. Natural aphrodisiacs. *Journal of Sexual Medicine*. v. 7, n. 1, p. 39 - 49, 2010.

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

SIES, H. Oxidative stress. London, Academic Press, p. 1 - 507, 1985.

SIES, H.; CADENAS, E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B, Biological Sciences. v. 311, p. 617 - 631, 1985.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology. v. 82, p. 291 - 295, 1997.

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. 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/phytochemistry-of-some-brazilian-plants-with-aphrodisiac-activity>. Acesso em: 18/03/2017

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK. P. R.(Orgs). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, p.1104, 2010.

SINGH, R.; ALI, A.; GUPTA, G.; GOVINDASAMY, J. Some medicinal plants with aphrodisiac potential: A current status. Journal of Acute Disease. v.2, n. 3, p. 179 - 188, 2013.

SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn . in. Journal of Men's Health. v. 8, p. 75 - 77, 2011.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. Sertoli Cell Biology. Elsevier Academic Press. p.494, 2005.

SMITH, LB, WALKER, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. Seminars in Cell and Developmental Biology. v. 30, p. 2 - 13, 2014.

SONI, D. K.; SHARMA, V.; CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. Effect of ethanolic extract of *Paederia foetida* Linn. leaves on sexual behavior and spermatogenesis in male rats. *Journal of Men's Health*. v. 9, n. 4, p. 268 - 276, 2012.

SWIERSTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoa transit through the epididymis. *Anatomical Record*. v. 161, p. 171 - 186, 1968.

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

TAE, H. J.; JANG, B. G.; AHN D. C.; CHOI, E. Y.; KANG, H. S.; KIM, N. S.; LEE, J. H.; PARK, S.Y.; YANG, H. H.; KIM, I. S. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Veterinary Research Communication.*, v. 7, p. 629 - 643, 2005.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*. v. 21, n.1, p. 7 - 13, 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 42, p. 289 - 306, 2006.

VELOZO, E. S.; BARRETO, M. M.; JESUS, E. L.; SILVA, C. V. A Etnofarmacologia dos terreiros nagôs-baianos. In: SERRA, O.; VELOZO, E. S.; BANDEIRA, F.; PACHECO, L.(Ed). *O Mundo das folhas*. Salvador - BA, Brasil, UEFS/EDUFBA, p.143 - 175, 2002.

VILEGAS, J. H. Y. Constituents of brazilian medicinal plants. Constituents of *Tynnanthus fasciculatus*. *Fitoterapia*. v. 64, n. 5, p. 476, 1993.

VILEGAS, W.; VILEGAS, H.Y.; POZETTI, G.L.; MORENO, R.M.S. The chemistry of “cipó-cravo”- *Tynanthus fasciculatus*. Revista Latinoamericana de Química. v.23, n.2, p. 47 - 49, 1994.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. Revista Brasileira de Nutrição Clínica. v. 23, n. 2, p. 141 - 149, 2008.

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.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction. v. 130, p. 15 - 28, 2005.

WANI, J. A.; ACHUR, R. N.; NEMA, R. K. Phytochemical screening and aphrodisiac property of *Asparagus racemosus*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. v. 3, n. 2, p. 112 - 115, 2011.

World Health Organization – WHO. WHA 31.33 Medicinal plants. Geneva: World Health Organization; 1978. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/wha3133.pdf>. Acesso em 19 janeiro 2017.

World Health Organization – WHO. WHA 40.33 Traditional medicine. Geneva: World Health Organization; 1987. Disponível em: <http://www.searo.who.int/entity/medicines/topics/wha4033.pdf>. Acesso em 19 janeiro 2017.

WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P. Sex determination and gonadal development in mammals. Physiological Reviews. v. 87, n. 1, p.1-28, 2007.

YAKUBU, M. T.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T. Aphrodisiac potentials of the aqueous extract of *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex Hiern) stem in male albino rats. *Asian Journal of Andrology*. v. 7, n. 4, p. 399 - 404, 2005.

YAKUBU, M. T.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T. Male sexual dysfunction and methods used in assessing medicinal plants with aphrodisiac potentials. *Pharmacognosy Reviews*. v. 1, p. 49 - 56, 2007.

YAKUBU, M. T.; AKANJI, M. A. Effect of aqueous extract of *Massularia acuminata* stem on sexual behaviour of male wistar rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v. 2011, p. 10, 2011.

YIN, J.; NI, B.; TIAN, Z.; YANG, F.; LIAO, W.; GAO, Y. Regulatory effects of autophagy on spermatogenesis. *Biology of Reproduction*. v. 96, n. 3, p. 525 - 530, 2017.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*. v. 24, n. 1, p. 147 - 152, 2001.

YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONGJIAN, J.; YONG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 9, p. 19 - 21, 1990.

YORDI, E. G.; PÉREZ, E. M.; MATOS, M. J.; VILLARES, E. U. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. *Nutrition, Well-Being and Health*. p. 23 - 48, 2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/antioxidant-and-prooxidant-effect-of-polyphenol-compounds-and-structure-activity-relationship-eviden>. Acesso em: 18/03/2017.

XIAO, X.; MRUK, D. D.; WONG, C. K. C.; CHENG, C. YAN. Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Physiology*. v. 29, n. 4, p. 286 - 298, 2014.

ZAMBLÉ, A. MARTIN-NIZARD, F.; SAHPAZ, S.; HENNEBELLE, T.; STAELS, B.; BORDET, R.; DURIEZ, P.; BRUNET, C.; BAILLEUL, F. Vasoactivity, antioxidant and aphrodisiac properties of *Caesalpinia benthamiana* roots. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 116, n. 1, p. 112 - 119, 2008.

ZHENG, B. L.; HE, K.; KIM, C. H.; ROGERS, L.; SHAO, Y.; HUANG, Z. Y.; LU, Y.; YAN, S. J.; QIEN, L. C.; ZHENG, Q. Y. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*. v. 55, p. 598 - 602, 2000.