

ANA PAULA DE LIMA FLORENTINO MATTA

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA RAIZ DE *PF AFFIA*
GLOMERATA (SPRENG.) PEDERSEN SOBRE TESTÍCULO E PÊNIS DE
CAMUNDONGOS 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
2012



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M415e
2012

Matta, Ana Paula de Lima Florentino, 1984-
Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de
Pygostylis glaucoerata (Sprang.) Poellmann sobre testículo e pênis
de camundongos adultos / Ana Paula de Lima Florentino
Matta. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 93f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

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

1. Reprodução animal. 2. Espermatogênese em animais.
3. Plantas medicinais. 4. Histopatologia. 5. Testosterona.
6. Camundongo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 573.6

ANA PAULA DE LIMA FLORENTINO MATTÁ

**EFETOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA RAIZ DE *PEFFIA*
GLOMERATA (SPRENG.) PEDERSEN SOBRE TESTÍCULO E PÊNIS DE
CAMUNDONGOS ADULTOS**

Tram 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 *Doutor Scientiarum*.

APROVADA: 08 de julho de 2012.



Elcio Chiarini-Garcia



Mariana Machado Neves



João Paulo Viana Leite



João Bosco Gonçalves de Barros



Sérgio Luiz Pinheiro da Matta
(Orientador)

ANA PAULA DE LIMA FLORENTINO MATTA

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA RAIZ DE *PFAFFIA*
GLOMERATA (SPRENG.) PEDERSEN SOBRE TESTÍCULO E PÊNIS DE
CAMUNDONGOS 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: 05 de julho de 2012.

Hélio Chiarini-Garcia

Mariana Machado Neves

João Paulo Viana Leite

João Bosco Gonçalves de Barros

Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nilton e Sônia

Ao meu esposo Paulo Roberto

A minha filha Ana Clara

Ao meu orientador Sérgio L. P. da Matta

“E, sobre tudo isto, revesti-vos de amor, que é o vínculo da perfeição”. Colossenses 3:14

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu força e sabedoria para realização desse trabalho.

Aos meus amados pais por todos os ensinamentos, pelo amor incondicional, pelas palavras incentivo e pelas orações.

Ao meu esposo Paulo Roberto pelos anos de dedicação, pela paciência, pelo companheirismo e compreensão em todos os momentos, pelas palavras de incentivo, por acreditar nos meus sonhos e me ajudar a conquistá-los. Com você ao meu lado, foi mais fácil vencer as dificuldades, esse título é nosso!

A minha amada filha Ana Clara, minha princesinha, que deu um novo sentido para minha vida. Esteve comigo desde o início do doutorado. Seu sorriso, seus primeiros passos, suas primeiras palavras foram para mim um estímulo permanente para realização de mais esta etapa acadêmica.

As minhas irmãs Fernanda e Daniele pelo carinho e cumplicidade, e ao meu querido sobrinho Miguel que tanto me alegra com seu abraço e sorriso.

A minha sogra pela ajuda constante, pelo incentivo e orações. Aos meus cunhados pela amizade e torcida, em especial a Andrea e Carlos Alberto (Nem).

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional.

Ao Programa de Apoio aos Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pela concessão de bolsa durante o período do doutorado.

Ao meu orientador Sérgio Luis Pinto da Matta por todos os ensinamentos, pela paciência, pela amizade, carinho e respeito. Serei sempre grata pela acolhida e por ter sido peça fundamental para esta conquista profissional.

Ao professor João Paulo Viana Leite, pelo auxílio desde o mestrado na preparação do extrato, realização na parte fitoquímica e contribuição nas correções.

A professora Mariana Machado Neves, pelo carinho, amizade e por ter se prontificado em colaborar na correção desse trabalho.

Ao professor João Bosco Gonçalves de Barros, pela contribuição nas correções anteriores de parte desse trabalho e por aceitar prontamente participar da banca examinadora de doutorado.

Ao professor Hélio Chiarini-Garcia pela colaboração nas correções desse trabalho.

Ao Jefferson, Sendy e Juliana Lima, bolsistas de iniciação científica pela amizade, contribuição durante o experimento e pelo auxílio nas análises.

A amiga Danielle Barbosa Moraes pelos anos de convivência nas disciplinas, no laboratório, pela prontidão em me ajudar sempre que necessário, pelo exemplo de trabalho sério que foi e continuará sendo para mim, pelo carinho e cumplicidade.

As amigas e companheiras de espematogênese Fabíola, Juliana Silveira, Kyvia, Marli e Pamella, por toda contribuição durante experimento e pela troca de idéias. Obrigada pelo apoio, pela força nos momentos de dificuldades, pelo carinho e amizade sincera em todos os momentos.

A Michele pela amizade, auxílio no experimento e parcerias realizadas.

Aos demais colegas e amigos em especial Nathália, Ana Carolina, Suellen e Maytê, com as quais compartilhei alegrias e dificuldades. Daiane, Karine, Diane, Marcos de Lucca, Bruna Moraes, Bruna Fontana, Wellington, Juliana Antonucci, Mônica Oliveira, Daniele Soares, Karine, Nathália, Jesylaine, Edalton, Claudivânia, Fabiana, Graziela, Tatiana, Bruna Moraes, Reggiane, Kenner, Arleti, Lílían, Luís Fernando, Sirlene, Rômulo, Alípio e Diego pelos momentos de cooperação e descontração. Guardarei sempre com muito carinho a lembrança de pessoas tão especiais!

A todos os professores do curso de Biologia Celular e Estrutural em especial ao Sérgio L. P. da Matta, Clóvis A. Neves, José Lino, Izabel R. S. C. Maldonado, Adilson A. Zácáro, Juliana Rocha, Mariana Machado Neves e Gustavo pela amizade, pelos ensinamentos nas disciplinas e pelo exemplo de profissionalismo.

A professora de graduação Ana Teresa César Silva, pela amizade, pelos ensinamentos e incentivo.

Aos funcionários de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural e do Departamento de Biologia Geral, Elizabeth, Diana, Salvadora, Alex e João pelo atendimento atencioso, pelo carinho e amizade.

Ao Departamento de Medicina Veterinária por ceder espaço e equipamento para a captura de imagens.

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

BIOGRAFIA

Ana Paula de Lima Florentino Matta, filha de Nilton José Florentino e Sônia Maria de Lima Florentino, nasceu em Duque de Caxias, Rio de Janeiro, em 22 de abril de 1984.

Em julho de 2006 graduou-se como licenciada em Ciências biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Santa Marcelina (FAFISM), Muriaé, Minas Gerais.

Em outubro de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, defendendo a dissertação em julho de 2008 com o título “Efeitos do extrato aquoso da raiz de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl. (Ochnaceae) sobre os testículos de camundongos Suíços adultos.”

Em julho de 2008, ingressou no programa de doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, defendendo a tese em 05 de julho de 2012.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Objetivos gerais.....	3
Objetivos específicos.....	3
Capítulo 1: Revisão de literatura.....	4
1.1. Plantas medicinais e fitoterápicos.....	4
1.2. Afrodisíacos: histórico e definição.....	6
1.3. Plantas afrodisíacas.....	7
1.4. Plantas que prejudicam as funções testiculares.....	9
1.5. <i>Pfaffia glomerata</i>	11
1.6. O testículo.....	12
1.7. Espermatogênese.....	13
1.8. Células de Sertoli.....	15
1.9. Células de Leydig.....	16
1.10. Os corpos cavernosos e o mecanismo da ereção peniana.....	17
2. Referências bibliográficas.....	19
Capítulo 2: Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen sobre a espermatogênese, produção espermática e indução apoptótica de células germinativas de camundongos adultos.....	30
RESUMO.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Coleta e preparação do extrato.....	33
2.2. Prospeção fitoquímica.....	34
2.3. Grupos experimentais e tratamento.....	35
2.4. Coleta de amostras e microscopia de luz.....	35
2.5. Biometrias corporal e testicular.....	35
2.6. Análise morfométrica dos testículos.....	36
2.6.1 Proporções volumétricas, volume dos componentes do testículo e índice tubulossomático.....	36
2.6.2. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero.....	36
2.6.3. Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo.....	36
2.6.4. Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero.....	37
2.6.5. Razões entre os números celulares.....	38
2.6.6. Número de células de Sertoli por testículo.....	38
2.6.7. Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo.....	39
2.7. Análises qualitativas e quantitativas histopatológicas.....	39
2.8. Técnica de TUNEL.....	40
2.8.1. Índice apoptótico.....	40
3. Análises estatísticas.....	40
4. RESULTADOS.....	41

4.1. Prospecção fitoquímica.....	41
4.2. Biometrias corporal e testicular.....	41
4.3. Análises morfométricas dos testículos.....	41
4.4. Análises quantitativas e qualitativas histopatológicas.....	42
4.5. Índice apoptótico.....	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
 Capítulo 3: Ação da Pfaffia glomerata nas células de Leydig, corpos cavernosos e na concentração de testosterona sérica de camundongos adultos.....	 68
RESUMO.....	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1. Planta e preparação do extrato.....	71
2.2. Grupos experimentais e tratamento.....	71
2.3. Coleta de amostras e microscopia de luz.....	72
2.4. Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo.....	72
2.5. Diâmetro, volumes nuclear e citoplasmático, número de células de Leydig por testículo, por grama de testículo, relação nucleoplasmática e índice Leydigossomático.....	72
2.6. Morfometria dos corpos cavernosos.....	73
2.7. Testosterona sérica.....	73
3. Análises estatísticas.....	74
4. RESULTADOS.....	74
4.1. Análise biométrica e morfométricas testiculares.....	74
4.2. Morfometria do tecido erétil.....	74
4.3. Concentração de testosterona sérica.....	74
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 93

RESUMO

MATTA, Ana Paula de Lima Florentino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Em várias partes do mundo é bastante difundida a prática de terapias à base de plantas com finalidades afrodisíacas. *Pfaffia glomerata* é uma espécie utilizada popularmente como estimulante sexual, tranquilizante, anti-inflamatório e cicatrizante. Neste trabalho buscou-se avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* (EHRPG) sobre parâmetros testiculares e penianos e na concentração de testosterona sérica de camundongos adultos, sendo o extrato submetido à prospecção fitoquímica. Foram utilizados 24 animais (6 animais por grupo) assim distribuídos: grupo 1 (G1) que recebeu água; grupo 2 (G2) que recebeu dimetilsulfóxido (DMSO); grupos 3 (G3) e 4 (G4) que receberam 300 e 400mg/kg de peso corporal do EHRPG, respectivamente, diluídos em 0,2 mL de DMSO. Todos os grupos foram submetidos a uma restrição calórica leve (10%). A análise fitoquímica revelou a presença de flavonóides, taninos, triterpenos/esteróides e saponinas. Os dois grupos tratados com o EHRPG apresentaram aumento na proporção da túnica própria, de lúmen e do peso corporal, mostrando redução na proporção e no volume de epitélio seminífero, no diâmetro tubular e nos índices gonadosomático (IGS), tubulossomático (ITS) e da célula de Sertoli. Esses animais apresentaram ainda alto índice apoptótico de células germinativas, além da ocorrência de patologia tubular. O grupo 4 apresentou ainda redução na altura do epitélio seminífero, nos números corrigidos de espermátócitos primários em preleptóteno/leptóteno e em paquíteno, na capacidade total de suporte da célula de Sertoli e na produção espermática. Ambos os grupos tratados apresentaram expressiva dilatação dos corpos cavernosos, sendo que, na concentração de 400mg, os animais tiveram também aumento na concentração de testosterona sérica. Pode-se concluir que o EHRPG tem efeitos negativos para a espermatogênese de camundongos, produzindo alterações patológicas nas células de Sertoli e germinativas, induzindo a apoptose de células germinativas e reduzindo a produção espermática. Adicionalmente, apresenta uma possível ação vasodilatadora e estimuladora da secreção de testosterona.

ABSTRACT

MATTA, Ana Paula de Lima Florentino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Effects of hydroalcoholic extract of the roots of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen on the penis and testis of adult mice.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

In several parts of the world is the widespread practice of herbal therapies with aphrodisiac purposes. *Pfaffia glomerata* is a species commonly used as a sexual stimulant, tranquilizer, anti-inflammatory and healing effects. This work aimed to evaluate the effects of the hydroalcoholic extract of the roots of *P. glomerata* (HERPG) on penile and testicular parameters and serum testosterone level of adult mice. The extract was subjected to phytochemical prospection. We used 24 animals (6 per group) distributed as follows: group 1 (G1) received water, group 2 (G2) received dimethylsulfoxide (DMSO), group 3 (G3) and 4 (G4) who received 300 and 400mg/kg body weight the HERPG, respectively, diluted in 0.2 ml DMSO. All groups were subjected to mild caloric restriction (10%). Phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, tannins, triterpenes/steroids and saponins. The two treated groups treated with HERPG showed an increase in the proportion the tunica propria, of the lumen and the body weight, and showing reduction in the proportion in volume of the seminiferous epithelium, and the diameter tubular and gonadosomatic (GSI), tubulesomatic (TSI) and Sertoli cell indexes. These animals also showed a high rate of apoptotic germ cells, besides the occurrence of tubular pathology. Group 4 showed also a reduction in height of the seminiferous epithelium, the numbers of primary spermatocytes in preleptóteno/leptotene and at pachytene, in total capacity of Sertoli cell-support and sperm production. Both treated groups showed significant dilatation of the corpus cavernosum, and the concentration of 400mg animals also had increased level of serum testosterone. It can be concluded that the HERPG has adverse effects on spermatogenesis in mice, producing pathological changes in Sertoli and germ cells and inducing apoptosis of germ cells, and reduce sperm production. In addition, provides a possible vasodilator and stimulating the secretion of testosterone.

INTRODUÇÃO GERAL

O presente estudo aborda aspectos da reprodução animal, enfocando os eventos que ocorrem na espermatogênese e a histologia dos corpos cavernosos sob influência do extrato vegetal obtido da espécie *Pffafia glomerata*. Dentre as diversas utilizações desta espécie na medicina popular, destaca-se seu uso como afrodisíaco, tendo sido administrada a camundongos machos mantidos em laboratório sob condições controladas.

A utilização de plantas medicinais como afrodisíacos, para resolver problemas de disfunção erétil ou 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 e Nascimento, 2006).

É possível que uma planta medicinal funcione como estimulante sexual e ao mesmo tempo interfira de forma negativa em parâmetros testiculares, alterando qualitativa e quantitativamente seus elementos e podendo inicialmente reduzir a produção espermática e em longo prazo causar alterações irreversíveis, levando até mesmo à infertilidade. A literatura cita plantas com propriedades farmacológicas anticancerígenas, antidiabética, hepatoprotetoras, cardioprotetoras e analgésicas, mas com efeitos adversos para as funções reprodutivas masculinas, em animais e humanos, tais como, *Ocimum sanctum* (Ahmed, 2002), *Sarcostemma acidum* (Venma et al., 2002), *Azadirachta indica*, (Aladakatti e Ahamed, 2005), *Syzygium aromaticum*, (Mishra e Singh, 2008). Por outro lado, algumas plantas utilizadas popularmente como afrodisíacas, agem aumentando a produção espermática e trazendo benefícios para os parâmetros testiculares, sendo que algumas delas tiveram seu potencial afrodisíaco comprovado, como observado 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, com ação sobre o comportamento e desempenho sexual humano pode ser simplesmente uma manifestação do efeito

placebo, o que reforça a importância dos estudos reprodutivos em espécies já amplamente utilizadas, especialmente sobre os testículos e corpos cavernosos do pênis.

O testículo é um órgão produtor de espermatozoides e andrógenos, sendo dividido funcionalmente em dois compartimentos básicos: o tubular ou espermato gênico e o intertubular ou androgênico. No epitélio seminífero do túbulo ocorre o processo de espermatogênese, 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 qualitativa e quantitativa desses dois compartimentos, após administração de determinada substância, é capaz de fornecer respostas sobre a ação positiva ou negativa da mesma no processo espermatogênico, na produção espermática e no funcionamento das células de Leydig.

Além da ação do extrato no testículo, investigações morfométricas do tecido cavernoso do pênis podem trazer respostas a respeito de uma possível ação vasodilatadora do extrato, um mecanismo de ação muito comum entre as plantas de uso popular já estudadas (Chen et al., 2000; Kim et al., 2011; Abdelwahab et al., 2012; Li et al., 2012).

Estudos experimentais e clínicos relatam que a testosterona tem papel importante na manutenção da homeostase e morfologia dos componentes dos corpos cavernosos, que são, por sua vez, essenciais para a fisiologia erétil normal (Castela et al., 2011), o que torna de suma importância a medida da concentração desse hormônio em animais tratados com plantas que tem seu uso popular como afrodisíaco.

Apesar da fama popular e até mesmo da comercialização de produto contendo compostos de *Pfaffia glomerata*, não há registros de experimentação científica avaliando a ação *in vivo* do seu extrato sobre parâmetros reprodutivos masculinos, o que mostra a importância de avaliar seus efeitos sobre os testículos, corpos cavernosos e na produção de testosterona.

Objetivos Gerais

O presente estudo pretendeu avaliar os efeitos de doses crescentes do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* em camundongos adultos, sobre as porções gametogênica e androgênica testicular, nos corpos cavernosos do pênis e no sangue. Essa avaliação foi feita através de investigação de mudanças morfológicas, histométricas e hormonal.

Objetivos Específicos

Prospecção fitoquímica

- Realizar a prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

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), mitótico, meiótico, Leydigossomático, da célula de Sertoli e apoptótico nas células germinativas;
- 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;
- Realizar a morfometria das células de Sertoli e células de Leydig.

Pênis

- Analisar morfológica e morfometricamente os corpos cavernosos.

Sangue

- Medir variações na concentração plasmática de testosterona.

Capítulo 1

1. Revisão de literatura

1.1. Plantas medicinais e fitoterápicos

Plantas medicinais podem ser definidas como todos os vegetais que têm emprego com fins terapêuticos, alicerçados no conhecimento popular ou no conhecimento científico (Schenkel et al., 2002). Todos os sistemas de medicina tradicional têm suas raízes fundamentadas na medicina popular e nos remédios caseiros, tendo as plantas medicinais um uso direto pela humanidade, sendo a fonte primária desta medicina (Panda et al., 2011). Até o século XIX, as plantas medicinais e seus extrativos constituíam a maioria dos recursos terapêuticos, e foi no início do século passado que esses recursos começaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época, estabelecendo aos poucos a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas. Juntamente com a síntese orgânica, a descoberta das substâncias ativas presentes nas plantas medicinais alavancou uma revolução científica e tecnológica, originando a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (Schenkel et al., 2002).

O início do processo de extração de princípios ativos de plantas ocorreu em 1803 com o isolamento da morfina da *Papaver somniferum* pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner. A partir de então outras substâncias foram isoladas, como por exemplo a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona* spp, em 1819, e a atropina da *Atropa belladonna*, em 1831, que passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (Tyler 1996; Schulz et al., 2001; Turolla e Nascimento, 2006). Essa substituição ocorreu devido a vários fatores dentre eles a produção de fármacos via síntese química, o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas, a ausência de comprovações científicas de eficácia das substâncias de origem vegetal aliada às dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados (Rates 2001). Observou-se então, após a década de 60, um desinteresse da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa pela busca de novas substâncias de origem vegetal, por se acreditar que já haviam sido isoladas as principais substâncias ativas das drogas vegetais conhecidas, bem como já haviam sido realizadas todas as possíveis modificações químicas de interesse destas substâncias (Schenckel et al., 2002). Porém, esse quadro mudou a partir da década de 80, com os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de

substâncias ativas a partir de fontes naturais, permitindo maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais (Turolla e Nascimento, 2006).

Atualmente, o modo de utilização das plantas medicinais/medicamento fitoterápico é amplo, tanto na medicina popular, quanto na medicina institucionalizada, sendo as mais generalizadas citadas como: (1) fornecedoras de substâncias ativas isoladas, (2) extratos purificados ou selecionados, centrados em grupos específicos de substâncias, (3) extratos totais, padronizados em relação a uma substância ou a uma especificação determinada e como (4) droga íntegra, rasurada ou moída ou destinada à preparação extemporânea de infusos ou decoctos aquosos (chás) (Schenkel et al., 2002). Esta ampla utilização gera a necessidade de mais pesquisas com as plantas medicinais, e, atualmente, esta se tornou uma das mais rápidas áreas de crescimento da pesquisa biomédica, sendo ilustrado pela seguinte observação: o número de citações PubMed, de 1990 - 2007 contendo a palavra "phytotherapy" foi inferior a 100 em 1990, subiu para mais de 1.000 em 1998, para 12.000 em 2005, e ficou acima de 15.000 em 2007 (Ameh et al., 2010b).

Em termos econômicos, estudos mostram as diferenças inter-regionais nas políticas de drogas vegetais e o impacto destas políticas sobre o estado e a movimentação de remédios extraídos de ervas no mercado mundial. Cerca de 80% das pessoas nos países em desenvolvimento fazem uso de terapias tradicionais, mas contribuíram com apenas 7,2% para o comércio em 1999. Por outro lado, em nações desenvolvidas, onde as pessoas dependem menos das ervas, a contribuição foi de 55,2%. Portanto, os países em desenvolvimento precisam de estratégias que irão promover a fitoterapia, e de fato contribuir substancialmente para qualquer economia (Ameh et al., 2010a). Por meio de vários instrumentos a Organização Mundial da Saúde (OMS) cria esforços para regulamentar essa medicina. Dentre eles, destacam-se três: a Declaração de Alma-Ata, de 1978, o Manual de Controle de Qualidade dos Materiais de Plantas Medicinais de 1998, e as Orientações Gerais para as Metodologias de Pesquisa e Avaliação de Medicina Tradicional de 2000 (Ameh et al., 2010b).

Os desafios enfrentados pela OMS geram em torno de uma globalização de práticas desenvolvidas ao longo dos séculos em certas comunidades, sem uma internacionalização simultânea das normas para sua avaliação e regulação. Em primeiro lugar, muitos países adotam políticas nacionais na medicina tradicional, o que torna difícil de regular tais práticas de modo global. Em segundo lugar, os meios para testar a

segurança, eficácia e qualidade das terapias tradicionais são altamente limitados para plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. A adequação de produtos depende da qualidade de suas matérias-primas, que muitas vezes incluem complexidade de componentes naturais. Em terceiro lugar, desde que os materiais de plantas medicinais são em sua maioria coletados no ambiente selvagem, a expansão do mercado da medicina herbal ameaça a biodiversidade. Assim, esforços devem ser feitos para preservar plantas selvagens e os conhecimentos indígenas para sua utilização na medicina. Em quarto lugar, muitos acreditam em uma falsa ideia de que ervas medicinais, por serem naturais, são seguras e livres de efeitos colaterais e/ou toxicidade (Ameh et al., 2010b).

Como ideia primordial, a utilização de fitoterápicos na medicina humana aumentaria a opção terapêutica dos profissionais de saúde, oferecendo medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos e com espectros de ação mais adequados (Lapa et al., 2002). Em virtude da importância das plantas medicinais e dos fitoterápicos para o homem é necessário que a sua produção, qualidade, distribuição e uso sejam regulamentados.

1.2. Afrodisíacos: histórico e definição

Por milhares de anos, a sociedade demonstrou uma dependência pelos afrodisíacos, já que em várias culturas (chinesa, egípcia, indiana, grega, romana) essas substâncias foram usadas como remédios tradicionais (Elferink, 2000; Melnyk e Marcone, 2011). A observação de que suas propriedades melhoravam a função sexual tornou seu uso popular, ainda que a base científica de muitos dos afrodisíacos naturais utilizados, não fosse ainda compreendida. Em culturas antigas, a procriação era o objetivo mais importante e a incapacidade de procriar aumentou os esforços para descobrir substâncias de fontes naturais que trouxessem melhora sexual (Elferink, 2000; Yakubu et al, 2007, Melnyk e Marcone, 2011). Afrodisíacos poderiam ser utilizados para auxiliar a capacidade de uma família ter filhos, mas também permitiria a realização sexual dentro de um casamento, que muitas vezes era insatisfatória (Yakubu et al., 2007). Nas culturas astecas, ter uma grande família era incentivado, respeitado e admirado pela sociedade (Elferink, 2000).

A definição moderna de afrodisíaco pode variar, mas é geralmente considerado como uma substância que aumenta o desejo (libido, por exemplo) e/ou prazer sexual. A definição foi ampliada para incluir as substâncias que melhoram o desempenho sexual

ou ajudam no bom funcionamento dos órgãos sexuais femininos e masculinos (Shamloul, 2010; Melnyk e Marcone, 2011). Eles aumentam o desejo e o prazer sexual através das propriedades alucinógenas ou estimulantes do humor. Além disso, o efeito afrodisíaco pode ocorrer por mudanças hormonais tendo ação sobre as células de Leydig e/ou na arquitetura e fisiologia peniana ou ainda 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).

Em várias cidades brasileiras existem casas de comercialização de produtos naturais, onde se encontram pelo menos uma seção específica à comercialização de plantas ou princípios delas extraídos relacionados à ação afrodisíaca. Geralmente, informações sobre a eficácia, modo de preparo e dosagem, vem de comunidades tradicionais que, ao longo dos anos, utilizam essas espécies e as indicam para melhorar o desempenho e a qualidade da vida sexual (Chieriegatto, 2005). Em virtude disso, a abordagem etnofarmacológica é uma estratégia utilizada muito importante, que consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais, que fazem uso da flora medicinal com estudos químico/farmacológicos realizados em laboratórios especializados. O método etnofarmacológico permite a formulação de hipóteses quanto à(s) atividade(s) farmacológica(s) e à(s) substância(s) ativas(s) responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas pelas populações usuárias (Elisabetsky, 2002).

A utilização de plantas como afrodisíacos, além de ser uma solução mais cômoda, pelo fato das ervas não estarem sujeitas a regulamentação rigorosa que existe em torno dos medicamentos, é confiável por grande parte da população que acredita que são seguros e livres de efeitos colaterais (Dumestre-Toulet et al., 2002; Venhuis et al., 2008).

1.3. Plantas afrodisíacas

A literatura relata uma série de plantas que foram submetidas a estudos experimentais tendo suas propriedades afrodisíacas comprovadas. Nem sempre, porém, os mecanismos de ação das mesmas foram elucidados. Alguns desses estudos são descritos a seguir.

O potencial afrodisíaco do caule de *Fadogia agrestis* (Rubiaceae) foi testado em ratos machos. Em todas as doses administradas observou-se aumento na frequência de montagem, de penetração e prolongamento da latência ejaculatória. A concentração

sérica de testosterona aumentou, sendo esse o possível mecanismo responsável por seus efeitos afrodisíacos (Yakubu et al., 2005; Malviya et al., 2011).

Lepidium meyenii (MACA) é uma das espécies de uso histórico para aumentar a fertilidade e o desejo sexual, sendo relatada em vários estudos que demonstram seu potencial em melhorar o comportamento sexual (Cicero et al., 2001; Cicero et al, 2002; Zheng et al, 2000). Ratos que receberam o extrato etanólico de MACA nas doses de 40, 45, 180 ou 1800 mg/kg mostraram um aumento significativo no acasalamento e melhora na função erétil em comparação ao grupo controle (Zheng et al., 2000). Resultados comportamentais foram confirmados utilizando extrato de MACA nas doses de 15 e 75 mg/kg de peso corporal (Cicero et al., 2001) e 24, 52 e 870 mg/kg do peso corporal dos extratos clorofórmico, hexânico e metanólico de MACA, respectivamente.

Para *Panax ginseng*, a maioria dos estudos relata que seus efeitos afrodisíacos estão relacionados aos seus constituintes bioativos conhecidos como gíngenosídeos, referentes às saponinas. Em estudo controlado com placebo, em que se buscou avaliar a eficácia do *Panax ginseng* em melhorar a disfunção erétil, 60 homens apresentando esse problema, em grau de leve a moderado, foram alimentados com 3000 mg do ginseng por dia ou placebo. Os resultados mostraram melhora significativa na ereção, incluindo rigidez e a penetração no grupo que recebeu o ginseng (de Andrade et al., 2007). Esses resultados foram também confirmados em outros estudos clínicos que demonstraram que o ginseng é realmente capaz de tratar a disfunção erétil (Choi et al., 1999; Choi e Choi, 2001; Hong et al., 2002; Jang et al., 2008). O mecanismo de ação sugerido é a liberação de óxido nítrico nas células endoteliais ou neurais causando o relaxamento da musculatura lisa, e aumento do fluxo sanguíneo para o pênis. Em estudo *in vitro*, *Panax ginseng* foi capaz de causar o relaxamento do músculo liso de coelhos, fortalecendo o argumento para o mecanismo proposto citado acima (Kim et al., 1998).

Para verificar o efeito do óleo essencial de *Satureja khuzestanica* (OESK) na fertilidade de ratos machos, administraram-se por via oral diluído em água, doses de 75, 150 e 225 mg/kg/dia. Os grupos tratados e controle foram colocados para acasalar após 45 dias de tratamento. O OESK melhorou todos os parâmetros avaliados, como potência de fecundidade, índice de fertilidade e tamanho da ninhada. As concentrações de Hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona estavam significativamente aumentadas nos grupos tratados com OESK, assim como os pesos dos testículos, da vesícula seminal e da próstata na dose de 225 mg/kg. Análise histopatológica mostrou que os animais tratados com OESK (150, 225 mg/kg) apresentaram aumento no número

de espermatogônias, espermáticos, de células de Leydig e de espermatozoides (Haeri et al., 2006).

A lista de plantas utilizadas na medicina popular como afrodisíacos é extensa, o que resulta em um aumento necessário no número de estudos para melhor compreender seus efeitos, mecanismos de ação e riscos de toxicidade. Com os estudos clínicos e com o isolamento e identificação dos constituintes ativos dessas plantas, os mecanismos de ação poderão ser bem-entendidos e o uso desses afrodisíacos para o tratamento de deficiências sexuais poderão tornar uma realidade.

1.4. Plantas que prejudicam as funções testiculares

Várias plantas utilizadas na medicina popular com propriedades farmacológicas anticâncerígenas, antidiabética, hepatoprotetoras, cardioprotetoras, analgésica dentre outras, foram relatadas como adversas às funções reprodutivas masculinas em animais e humanos. Os efeitos observados têm sido atribuídos para as propriedades antiespermatogênicas e/ou antiesteroidogênicas de um ou mais compostos ativos, sendo os efeitos tóxicos identificados ao administrá-los para fins terapêuticos e/ou durante a pesquisa de anticoncepcionais (D'Cruz et al., 2010).

Apesar de o testículo ser equipado com sistemas de fortes defesas intrínsecas que protegem as células germinativas durante sua jornada espermatogênica e pós-espermatogênica, é um órgão muito vulnerável ao ataque de fármacos, e isso é refletido adversamente na saúde reprodutiva masculina com o passar de vários anos (D'Cruz et al., 2010). O aparelho reprodutivo masculino é extremamente sensível a vários fatores ambientais, dentre os quais estão estilo de vida, radiação, poluição e fatores tóxicos. Seus efeitos podem ser anormalidades congênitas na infância e alterações funcionais no adulto (Saradha e Mathur, 2006).

Diversos produtos naturais e sintéticos atuam negativamente sobre a espermatogênese e androgênese. No primeiro caso, os alvos podem ser as células germinativas, as células de Sertoli ou os espermatozoides que podem ser prejudicados morfolologicamente ou na motilidade. Em nível hormonal, a ação pode ser diretamente sobre as células de Leydig, sobre as enzimas esteroidogênicas ou ainda causando um decréscimo na concentração de testosterona (D'Cruz et al., 2010). Algumas das plantas utilizadas na medicina popular para variados fins e que trazem prejuízos espermatogênico e/ou esteroidogênico, são descritas a seguir.

O extrato benzênico das folhas de *Ocimum sanctum*, quando administrada em ratos machos na dose de 250 mg por kg de peso corporal por 48 dias, diminui a quantidade espermática, a motilidade e a velocidade de deslocamento dos espermatozoides, sendo os efeitos reversíveis após duas semanas com a retirada do tratamento (Ahmed et al., 2002). Vacúolos intraepiteliais de diferentes tamanhos no citoplasma das células de Sertoli e perturbações na coexistência de Sertoli/Sertoli e Sertoli/células germinativas foram observados quando o pó da folha *Azadirachta indica* foi administrado a ratos albinos durante 48 dias (Aladakatti e Ahamed, 2005). Camundongos que receberam o extrato de *Syzygium aromaticum*, planta utilizada como agente afrodisíaco, apresentaram aumento na proporção de túbulos patológicos, com vacuolizações em células de Sertoli e degeneração de várias células germinativas (Mishra e Singh, 2008). Administração do extrato metanólico de *Sarcostemma acidum* em uma dose de 100 mg em ratos machos albinos por 60 dias provocou uma diminuição no número de células de Leydig maduras e um aumento da degeneração da população das células de Leydig (Venma et al., 2002). O extrato etanólico das raízes da *Martynia annua* em ratos machos em doses de 100 e 200 mg por kg de peso corporal por 60 dias causou atrofia das células de Leydig e uma redução significativa na concentração sérica de Hormônio luteinizante (LH) e testosterona (Mali et al., 2002).

Um ponto importante que deve ser considerado no estudo de plantas da medicina popular é sua toxicidade. Os relatos populares sobre intoxicações acidentais são importantes para esses estudos, porém, nem sempre esses relatos dão informações suficientes sobre a quantidade, ou a parte da planta ingerida, ou ainda sua identificação através de nomes científicos. Além disso, a produção dos metabólitos secundários pode variar de acordo com a idade das plantas, o estado reprodutivo, as estações do ano ou horas do dia (Brown Júnior, 1988), informações muitas vezes ignoradas popularmente. Não é surpreendente que muitas plantas acumulem substâncias de elevada toxicidade, já que uma das funções dos metabólitos secundários é promover a defesa do vegetal contra potenciais predadores (Santos, 2002). Além dos relatos populares que dão uma ideia inicial para o estudo, a verificação da toxicidade de uma planta depende principalmente de experimentos em animais, já que eles podem direcionar a ensaios clínicos, desde que consigam reproduzir a toxicidade em seres humanos e os efeitos não sejam irreversíveis.

1.5. *Pfaffia glomerata*

Pfaffia glomerata pertence à família Amaranthaceae e encontra-se distribuída em toda América do Sul, tropical e subtropical, desde as Guianas até Bolívia e Argentina, sendo que no Brasil ocorre principalmente no Paraná e Mato Grosso do Sul (Teske e Trentini, 2001), além de São Paulo, Paraná, Mato Grosso e Goiás (Neto et al., 2005; Silva et al., 2010), ao longo de formações florestais e campestres (Magalhães, 2000; Guerreiro et al., 2009). É relatada uma variedade de nomes populares para a espécie, tais como fáfia, ginseng-brasileiro, para-tudo, suma, corrente, carango-sempre-viva, acônito, caxixe, batata-do-mato e ginseng-do-pantanal (Nicoloso et al., 2001; Otofugi, 2005; Silva et al., 2010). O termo “ginseng” é de origem chinesa e etimologicamente significa aspecto humanoide (Jin = homem e Chen = aspecto), assim como ocorre com a raiz do ginseng asiático (*Panax ginseng*) (Vigo et al., 2004; Otofugi, 2005).

As raízes de *P. glomerata* são ricas em saponinas, com importantes atividades farmacológicas. Destaca-se a β -ecdisona, uma saponina esteroideal, como seu principal componente, com teores nas raízes que podem variar entre 0,3% a 0,75%, dependendo da época de colheita, variação genética e fertilidade do solo (Figueiredo, 2002; Correia Júnior, 2003; Alves et al., 2006; Queiroga et al., 2008). A presença de β -ecdisona dá a espécie atividade adaptógena contra estresses físico e mental (Vigo et al., 2003; Kamada et al., 2009).

Com base nos conhecimentos etnobotânicos, são atribuídos às raízes e folhas de *P. glomerata* têm efeitos afrodisíacos e estimulantes gerais, tranquilizantes, antirreumáticos, antidiarreicos, anti-inflamatórios, antidiabéticos, febrífugas, cicatrizantes internas e externas, anti-hemorroidais, melhoradoras da visão e da memória e para o tratamento de distúrbios gástricos, artrite, artrose, anemia, astenia e dores. Suas propriedades medicinais foram comprovadas como anti-inflamatório e analgésico (Neto et al., 2005; Queiroga et al., 2008), no processo de cicatrização de feridas da pele (Guerreiro et al., 2009; Silva et al., 2010) e no efeito protetor da mucosa gástrica (Otofugi, 2005), ação benéfica na aprendizagem e memória de ratos idosos em modelos crônicos (Marques, 1998). Outros trabalhos relataram efeitos negativos do extrato exibindo atividade depressora do sistema nervoso central e efeito amnésico (De-Paris et al., 2000) efeitos tóxicos em ratas prenhes (Toledo et al., 2004). Outros resultados parciais de estudos realizados com extratos glicólicos de *Pfaffia glomerata*, demonstraram que folhas e flores possuem significativa atividade antioxidante, inibindo

a oxidação de lipídios de membrana mitocondrial dos danos oxidativos induzidos por Fe²⁺/citrato, porém o extrato da raiz, não é capaz de proteger lipídios de tais danos (Camillo e Rodrigues, 2009).

Em decorrência do crescente interesse da população pelos medicamentos fitoterápicos e da atividade extrativista, o estudo da diversidade da *P. glomerata*, assim como seu cultivo comercial, vêm se tornando indispensáveis. Instituições de pesquisa vêm realizando frequentes coletas de germoplasma, uma vez que os riscos de perda da variabilidade são acentuados pelo extrativismo desordenado e comercialização de suas raízes (Alves et al., 2006; Kamada et al., 2009). A *P. glomerata* apresenta de fato um potencial risco de entrar em extinção devido à coleta indiscriminada e pela diminuição das suas áreas de ocorrência natural (Guerreiro et al., 2009).

1.6. O testículo

O testículo é um órgão complexo, produtor de espermatozoides e andrógenos, que mantém as funções reprodutivas e as características sexuais secundárias. As células germinativas formam os espermatozoides no processo espermatogênico, enquanto as células somáticas são o suporte para ambas as funções (Russell e França, 1995). Esse órgão é envolvido pela albugínea, uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso que emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino, dividindo o testículo em lóbulos. Nos mamíferos, o testículo é dividido em dois compartimentos: o intertubular ou intersticial, também chamado de espaço intertubular, e o compartimento de túbulos seminíferos (Russell et al., 1990). Os túbulos constituem a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França e Russell, 1998; Godinho, 1999). Eles formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, que se encontra localizada numa região bastante rica em vasos e tecido conjuntivo, denominada 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 lume. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mióides e elementos acelulares, como fibras colágenas e a membrana basal. As células mióides são contráteis, sendo responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozoides através do

lume tubular. No epitélio seminífero são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli (Russell et al., 1990a).

Juntamente com as células mióides, 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 ambiente basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos), e o ambiente adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta forma, 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 (Russell et al., 1990a; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 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 espaço intertubular encontram-se células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos e macrófagos (Russell et al., 1990a; Setchell, 1991). Ratos e camundongos apresentam um padrão de intertúbulo em que as células de Leydig estão associadas a vasos sanguíneos e rodeadas pelo fluido linfático (Fawcett et al., 1973).

1.7. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo sincrônico, que dura cerca de 40 a 60 dias nos mamíferos estudados, no qual uma espermatogônia (célula diploide) se diferencia gradativamente em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide (França e Russell, 1998; Godinho, 1999). 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, na qual o material genético é recombinado e segregado, onde cada espermatócito dá origem a 4 espermátides e 3) fase de diferenciação ou espermiogênica em que espermátides se transformam em células especializadas estruturalmente e bioquimicamente para alcançar e fertilizar o ovócito, os espermatozoides (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994).

As células de Sertoli sustentam morfofisiologicamente as quatro camadas distintas de células germinativas que compõem o epitélio seminífero. As espermatogônias e os espermatócitos primários iniciais encontram-se na camada basal do epitélio, enquanto que na camada adluminal observam-se as gerações de espermatócitos mais desenvolvidos, espermatócitos secundários e espermátides (Russell et al., 1990). A espermatogênese inicia-se com a célula germinativa primitiva, a espermatogônia A. 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 próximos da luz dos túbulos seminíferos e é difícil observá-los nos cortes histológicos, pois entram logo 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 a 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 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 (Berndtson, 1977; França e Russell, 1998), e o método do sistema acrossômico, no qual o número de estádios é varia entre as espécies (Leblond e 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 lume do túbulo seminífero (Amann e Schanbacher, 1983; França e Russell, 1998).

1.8. Células de Sertoli

As células de Sertoli são células somáticas, de aspecto colunar, que se estendem da base dos túbulos seminíferos até o lúmen tubular, residente entre as células germinativas (Russell et al., 1990). Estas células providenciam um microambiente e um suporte citoarquitetural para o desenvolvimento das células espermátogênicas, e regulam 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 influencia o conteúdo físico e ambiente extracelular entre as células, e os regulatórios (fatores de crescimento) (Skinner e Griswold, 2005).

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, caminho de proteínas, formação de pseudópodes e outras extensões citoplasmáticas tais como microvilos, 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 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 orientação espacial, sustentação, aumento das superfícies de contato para trocas metabólicas e movimentação das células germinativas (Russell et al., 1990; Hess e França, 2005).

As células de Sertoli fazem a compartimentalização do epitélio seminífero, dividindo-o em ambientes permanentes (basal e adluminal) e transitório (intermediário) que 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 presença de um ambiente intermediário assegura que a integridade da barreira de Sertoli seja mantida durante esse trânsito citado anteriormente. A barreira permite que muitas substâncias entrem no ambiente adluminal, mas usualmente, baixos níveis destas substâncias atingem o lúmen tubular quando comparado com o sangue ou a linfa (Russell et al., 1990).

A célula de Sertoli secreta o fluido luminal que é o meio pelo qual os espermatozoides são transportados dentro dos sistemas de ductos. A barreira de Sertoli previne a saída de fluido do lúmen para a linfa e a pressão do fluido mantém o lúmen tubular. Outra importante função desempenhada pelas células de Sertoli é a fagocitose. São capazes de fagocitar células germinativas que degeneram durante o curso da espermatogênese, fagocitam complexos tubulobulbares durante a espermição e os corpos residuais que restam durante o processo de espermição (Russell et al., 1990).

1.9. Células de Leydig

As células de Leydig são originadas nos testículos durante o período embrionário. No início do desenvolvimento, a proliferação dessas células 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 α , que podem estimular os progenitores dessas células (Ge et al., 1996).

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 e Hardy, 2007). Segundo estes autores, 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 (Russell, 1996; Payne e 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 e Coffey, 1994; Fan e Robaire, 1998; Goyal et al., 1999). A síntese de testosterona é controlada por hormônios produzidos pela hipófise, mais especificamente o hormônio luteinizante (LH) (Colleta e Carvalho, 2005).

1.10. Os corpos cavernosos e o mecanismo da ereção peniana

O pênis é constituído pela uretra e três corpos cilíndricos de tecido erétil, sendo que dois deles, corpos cavernosos do pênis, estão localizados na parte dorsal do órgão, e o terceiro, corpo cavernoso da uretra, localizado ventralmente. Os corpos cavernosos são compostos de tecido erétil, contendo grande quantidade de espaços venosos separados por trabéculas de fibras de tecido conjuntivo e células musculares lisas, e são envolvidos pela túnica albugínea, um invólucro fibroso denso (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os corpos cavernosos constituem a principal massa do corpo do pênis, formando o seu dorso e partes laterais. O tecido erétil dos corpos cavernosos é irrigado, em sua maior parte, pela artéria cavernosa, que ao longo de seu curso, fornece várias artérias helicinais que vão suprir o tecido trabecular (Gray, 1988). O tecido conjuntivo nele presente deve permitir o alongamento e aumento da rigidez durante a ereção e proporcionar resistência adequada para retornar rapidamente para o estado flácido após detumescência, enquanto as fibras musculares lisas devem relaxar para manter a ereção, aumentando a pressão intracavernosa durante a ereção, a qual não podia ser alcançada apenas por mecanismos vasculares. Assim, a fim de alcançar uma função normal do pênis, uma porcentagem adequada de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo é necessária (Costa et al., 2006).

Segundo Traish (2009), os andrógenos são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da estrutura peniana, sendo capazes de regular a fisiologia erétil por vários mecanismos. Com base em seus estudos, os andrógenos desempenham um papel central na manutenção da estrutura e função da rede de nervo periférico do pênis, a integridade estrutural dos corpos cavernosos, da túnica albugínea, e do endotélio dos espaços cavernosos. Além disso, desempenham papel importante na regulação da diferenciação de células precursoras em células musculares lisas trabecular.

A função erétil é um mecanismo fisiológico neurovascular complexo que depende da interação de fatores neural, vascular, hormonais, bem como da integridade estrutural dos componentes celulares do pênis (Bivalacqua et al., 2003; Traish, 2009; Castela et al., 2011).

Fisiologicamente, a ereção peniana envolve a ação do NO (óxido nítrico), da enzima guanilil ciclase, do GMP cíclico (monofosfato de guanosina) e da enzima PDE 5 (fosfodiesterase tipo 5). A estimulação sexual faz com que o NO seja liberado de

terminais nervosos nitrérgicos e de células endoteliais sobre os corpos cavernosos do pênis, ocorrendo assim à ativação da enzima guanilil ciclase que aumenta a conversão de GTP para cGMP. O cGMP se liga com elevada afinidade a proteína quinase cGMP dependente e ativa esta enzima a causar a fosforilação de numerosas proteínas celulares que estão envolvidas na modulação do nível de cálcio celular e nas rotas regulamentadas de cálcio. O cGMP é inativado pela fosfodiesterase 5 (PDE5). Assim, inibidores de PDE5, como por exemplo, o sildenafil, vardenafil e tadalafil e iodenafil, desempenham um papel crítico na modulação de segundo mensageiro de sinalização, por inibição da hidrólise de AMPc e GMPc (Hofmann, 2005, Bhasin e Benson, 2006; Ghofrani et al., 2006; Senbel et al., 2012).

Histologicamente, durante a ereção, o pênis é capaz de acumular sangue sob pressão, num processo denominado função veno-oclusiva descrita a seguir. Com a estimulação sexual a liberação de óxido nítrico (NO) causa dilatação das artérias cavernosas e arteríolas helicinais do pênis, e o relaxamento do músculo liso trabecular. Esse relaxamento, leva à expansão corporal contra a albugínea peniana, causando oclusão das vênulas de drenagem e reduzindo a saída de sangue. Como o fluxo venoso corporal é ocluído, a pressão corporal se eleva e atinge um patamar, causando assim a ereção peniana. Quando o músculo liso trabecular está totalmente relaxado, a pressão intravenosa é dependente da pressão arterial cavernosa e das propriedades fibroelásticas do tecido (Krane et al, 1989; Saenz de Tejada et al, 1991; Nehra et al, 1998, Traish, 2009).

Portanto, a arquitetura do tecido desempenha um papel importante na função veno-oclusiva, e qualquer patologia que contribua para alterar essa arquitetura irá resultar em disfunção veno-oclusiva. Por outro lado, dependendo da substância administrada, a alteração poderia resultar em aumento no diâmetro dos corpos cavernosos, aumentando o aporte sanguíneo, agindo como um vasodilatador. Com as análises morfométricas nos cortes histológicos dos corpos cavernosos do pênis, em animais tratados com plantas popularmente utilizadas como estimulante sexual, é possível obter algumas respostas sobre o possível mecanismo afrodisíaco atribuído as mesmas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHAB, S. I.; MOHAMED, A. H.; MOHAMED, O. Y.; OALL, M.; TAHA, M. M. E.; MOHAN, S.; NOORDIN, M. I.; MUSTAFA, M. R.; ALKHARFY, K. M. Erectogenic effects of *Clerodendron capitatum*: Involvement of phosphodiesterase type-5 Inhibition. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012:1-6, 2012.

AHMED, M.; AHAMED, R. N.; ALADAKATTI, R. H.; GHOSSEAWAR, M. G. Reversible anti-fertility effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on sperm parameters and fructose content in rats. Journal of Basic and Clinical Physiology, 13:51-9, 2002.

ALADAKATTI, R. H.; AHAMED, R. N. Changes in Sertoli cells of albino rats induced by *Azadirachta indica* A. Juss leaves. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 16:67-80, 2005.

ALVES, R. B. N.; MENDES, R. A.; MENDES, M. A.; CARNEIRO, R. M. D. G.; SILVA, D. B.; CARDOSO, L. D.; SALOMÃO, N. A.; VIEIRA, R. F. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germoplasm conservation. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 8:1-4, 2006.

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

AMEH, S. J.; OBODOZIE, O. O.; ABUBAKAR, M. S.; GARBA, M. Current phytotherapy - an inter-regional perspective on policy, research and development of herbal medicine. Journal of Medicinal Plants Research, 4:1508-1516, 2010a.

AMEH, S. J.; OBODOZIE, O. O.; INYANG, U. S.; ABUBAKAR, M. S.; GARBA, M. Current phytotherapy - A perspective on the science and regulation of herbal medicine. Journal of Medicinal Plants Research, 4:72-81, 2010b.

BHASIN, S.; BENSON, G. S. Male Sexual Function. IN: CHALES, J. R. G.; PFAFF, D. W.; PLANT, T. M.; KRETZER, D. M.; RICHARDS, J. S.; WASSARMAN, P. M. (eds). Physiology of Reproduction. San Diego: Elsevier, p: 949-975, 2006.

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

BIVALACQUA, T. J., USTA, M. F., CHAMPION, H. C., ADAMS, D.; MCNAMARA, D. B.; ABDEL-MAGEED, A. B.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. G. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase partially restores nitric oxide synthesis and erectile function in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Urology*, 169:1911-1917, 2003.

BROWN JÚNIOR, K. S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. *Acta Amazônica*, 18:291-303, 1988.

CAMILLO, Z. M.; RODRIGUES, T. Caracterização da atividade antioxidante de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson: estudo comparativo entre extratos de folhas, flores e raiz. *Anais do XII Congresso de Iniciação Científica, Universidade de Mogi das Cruzes*, 2009.

CASTELA, A.; VENDEIRA, P.; COSTA, C. Testosterone, endothelial health, and erectile function. *International Scholarly Research Network ISRN Endocrinology*, 2011:1-7, 2011.

CHEN, J.; CHIOU, W.; CHEN, C.; CHEN, C. Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue *in vitro*. *American Urological Association*, 163:1975-1980, 2000.

CHIEREGATO, L. C. Efeito do Tratamento Crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 67p, 2005(Dissertação, mestrado).

CHOI, H. K.; CHOI, Y. D.; ADAIKAN, P. G.; JIANG, Y. Effectiveness of Korean red ginseng in erectile dysfunction - Multi-national approach. *Journal of Ginseng Research*, 23:247-256, 1999.

CHOI, H. K.; CHOI, Y. J. Evaluation of clinical efficacy of Korean red ginseng for erectile dysfunction by international index of erectile function (IIEF). *Journal of Ginseng Research*, 25:112-117, 2001.

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*, 75:225-229, 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*, 34:177-179, 2002.

COSTA, W. S.; CARRERETE, F. B, HORTA, W. G, SAMPAIO F. J. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *British Journal of Urology International*, 97:567-569, 2006.

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

CORREIA JÚNIOR, C. Estudo Agrônômico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): Sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 94p, 2003 (Tese, doutorado).

DE ANDRADE, E.; DE MESQUITA A. A.; CLARO, J. A.; DE ANDRADE P. M.; ORTIZ, V.; PARANHOS, M.; SROUGI, M. Study of the efficacy of Korean Red Ginseng in the treatment of erectile dysfunction. *Asian Journal of Andrology*, 9:241-244, 2007.

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

DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S. M. K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. Journal of Ethnopharmacology, 73:261-269, 2000.

DUMESTRE-TOULET, V.; CIRIMELE, V.; GROMB, S.; BELOOUSOFF, T.; LAVALT, D.; LUDS B.; KINTZ, P. Last performance with VIAGRA: post-mortem identification of sildenafil and its metabolites in biological specimens including hair sample. Forensic Science International, 126:7176, 2002.

ELFERINK, J. G. R. Aphrodisiac use in pre-Columbian Aztec and Inca cultures. Journal of the History of Sexuality, 9:25-36, 2000.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (eds). Farmacognosia da planta ao medicamento. 4. ed. Florianópolis: Universitária, p:91-103, 2002.

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

FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biology of Reproduction, 9:500-532, 1973.

FIGUEIREDO, L. S. Avaliação do comportamento em cultivo de campo *in vitro* de indivíduos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual Norte Fluminense, 60p, 2002 (Tese, doutorado).

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

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

GHOFRANI, H. A.; OSTERLOH, I. H.; GRIMMINGER, F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature Reviews*, 5:689-702, 2006.

GODINHO, C. L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 74p, 1999 (Dissertação, mestrado).

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*, 254:508-520, 1999.

GRAY, D. J. Região perineal e órgãos genitais externos. In: GARDNER, E.; GRAY, D. J.; RAHILLY, R. (eds). *Anatomia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p:485-495, 1988.

GUERREIRO, C. P. V.; MARQUES, M. O. M.; FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N.; MING, L. C. Produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função da adubação orgânica em 6 épocas de crescimento. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11:392-398, 2009.

HAERI, S.; MINAIE, B.; AMIN, G.; NIKFAR, S.; KHORASANI, R.; ESMAILY, H.; SALEHNIA, A.; ABDOLLAHI, M. Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on male rat fertility. *Fitoterapia*, 77:495-499, 2006.

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*, 73:243-278, 2010.

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

HOFMANN, F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 280:1-4, 2005.

HONG, B.; JI, Y. H.; HONG, J. H.; NAM, K.Y.; AHN, T.Y. A double-blind crossover study evaluating the efficacy of Korean red ginseng in patients with erectile dysfunction: A preliminary report. *Journal of Urology*, 168:2070-2073, 2002.

JANG, D. J.; LEE, M. S.; SHIN, B. C.; LEE, Y. C.; ERNST, E. Red ginseng for treating erectile dysfunction: A systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 66:444-450, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica. Texto e Atlas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 10 ed, p:415-431, 2004.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; VIEIRA, R. F.; BARBOSA, L. C. A.; CRUZ, C. D.; OTONI, W. C. Variação de caracteres morfológicos e fisiológicos de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e correlação com a produção de β -ecdisona. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11:247-256, 2009.

KIM, H. J.; WOO, D. S.; LEE, G.; KIM, J. J. The relaxation effects of ginseng saponin in rabbit corporal smooth muscle: Is it a nitric oxide donor? *British Journal of Urology*, 82:744-748, 1998.

KIM, H. K.; BAK, Y. O. K.; CHOI, B. R.; ZHAO, C.; LEE, H. J.; KIM, C. Y.; LEE, S. W.; JEON, J. H.; PARK, J. K. The role of the lignan constituents in the effect of *Schisandra chinensis* fruit extract on penile erection. *Phytotherapy Research*, 25:1776-1782, 2011.

KRANE, R. J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Impotence. *New England Journal of Medicine*, 321:1648-1659, 1989.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LADMAN, M. T. R.; LIMA, M. T.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (eds). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4. ed. Florianópolis: Universitária, p:183-198, 2002.

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*, 55:548-573, 1952.

LI, X.; OH, H. C.; SON, S. B.; LEE, Y. J.; KANG, D. G.; LEE, H. S. Effect of an ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* on relaxation in corpus cavernosum smooth muscle. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:1-10, 2012.

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

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: BERNAL, J. V. M. (eds.). *Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas*. Santafé de Bogotá: Cyted, p:323-32, 2000.

MALI, P. C.; ANSARI, A. S.; CHATURVEDI, M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 82:61-7, 2002.

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*, 68:3-8, 2011.

MARQUES, L. C. Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen- amaranthaceae. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 145p, 1998 (Tese, doutorado).

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

MISHRA, R. K.; SINGH, S. K. Safety assessment of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) extract with respect to testicular function in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 46:3333-3338, 2008.

NETO, A. G.; COSTA, J. M.; BELATIA, C. C.; VINHÓLIS, A. H.; POSSEBOM, L. S.; DA SILVA, F. A. A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J. C.; BASTOS, J. K.; SILVA,

M. L. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. *Journal of Ethnopharmacology*, 96:87-91, 2005.

NEHRA, A.; AZADZOI, K. M.; MORELAND, R. B.; PABBY, A.; SIROKY, M. B.; KRANE, R. J.; GOLDSTEIN, I.; UDELSON, D. Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. *Journal of Urology*, 159:2229–2236, 1998.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2:11-18, 2001.

OTOFUGI, G. M. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 177p, 2005 (Dissertação, mestrado).

PANDA, S. K.; ROUT, S. D.; MISHRA, N.; PANDA, T. Phytotherapy and traditional knowledge of tribal communities of Mayurbhanj district, Orissa, India. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3:101-113, 2011.

PAYNE, A.H.; HARDY, M.P. The Leydig cell in health and disease. Humana Press:New Jersey, p:471, 2007.

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.

QUEIROGA, C. L.; SALANDIN, M.; FILHO, A. A. S.; BASTOS, J. K.; FILHO, E. A. S.; MONTANARI, I.; CATHARINO, R.; EBERLIN, M. N. Atividade anti-inflamatória de saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, p:1241-1242, 2008.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39:603-613, 2001.

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, 1990.

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

RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (eds). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, p:218-222, 1996.

SAENZ DE TEJADA, I.; CARSON, M. P.; DE LAS MORENAS, A.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A. M. Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *American Journal of Physiology*, 261:1078-1085, 1991.

SANDRONI, P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. *Clinical Autonomic Research*, 11:303-307, 2001.

SARADHA, B.; MATHUR, P. P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21:34-41, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (eds). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4 ed. Florianópolis: Universitária, p: 333-364, 2002.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de Origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (eds). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4. ed. Florianópolis: Universitária, p: 301-330, 2002.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. Medicinal plants, phytomedicine, and phytotherapy. In: *Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine*. 4.ed. New York, Berlin: Springer, p:1-39, 2001.

- SENBEL, A. M.; HASHAD, A.; SHARABI, F. M.; DAABEES, T. T. Activation of muscarinic receptors inhibits neurogenic nitric oxide in the corpus cavernosum. *Pharmacological Research*, 65:303-311, 2012.
- 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*, 7:39-49, 2010.
- SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (eds). *The physiology of reproduction*, 2. ed. New York: Raven Press, p: 1363-1434, 1994.
- SILVA, M. I.; RIBAS-FILHOJ, M.; MALAFAIA, O.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, M. M.; VARASCHIM, M.; CZECZKO, L. E. A utilização da *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 4:228-233, 2010.
- SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press, p:494, 2005.
- TESKE, M.; TRENTINI, A. M. *Herbarium: compêndio de fitoterapia*. 4 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório, p:317, 2001.
- TOLEDO, M. R. S.; SILVA, C. C. A.; ANTONELLO, D.; PIMENTA, K. R.; VIEIRA, M. C.; RAMOS, M. B. M.; HEREDIA, N. A. Z.; SCALON, S. P. Q.; BAZZANO, T. S.C. Extratos aquosos de *Pfaffia glomerata* Spreng e seu efeito tóxico em ratas prenhes, *Revista Horticultura Brasileira*, 22: 493, 2004.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42:289-306, 2006.
- TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S. A. (eds) *Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health*. New York: Columbia University Press, p:3-10, 1996.

VENHUIS, B. J.; BLOK-TIP, L.; DE KASTE, D. Designer drugs in herbal aphrodisiacs. *Forensic Science International*, 177:25-27, 2008.

VENMA, P. K.; SHARMA, A.; MATHUR, A.; SHARMA, P.; GUPTA, R. S.; JOSHI, S.C.; DIXIT, V. P. Effect of *Sarcostemma acidum* stem extract on spermatogenesis in male albino rats. *Asian Journal of Andrology*, 4:43-7, 2002.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14:137-144, 2004.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação metodológica de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen-Amaranthaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13:46-49, 2003.

TRAISH, A. M. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: A review. *Journal of Andrology*, 30:363-369, 2009.

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*, 7:399-404, 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*, 1:49-56, 2007.

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 benthiana* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 116:112-119, 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*, 55:598-602, 2000.

Capítulo 2

Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre a espermatogênese, produção espermática e indução apoptótica de células germinativas de camundongos adultos

RESUMO

A *Pfaffia glomerata* é uma das espécies conhecidas como ginseng brasileiro e suas raízes são utilizadas na medicina popular como afrodisíaco, tranquilizante, anti-inflamatório e cicatrizante. Os objetivos deste trabalho foram analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* (EHRPG), qualitativa e quantitativamente, sobre o compartimento gametogênico testicular de camundongos e investigar os grupos de metabólitos secundários presentes no extrato. Adicionalmente foi analisada a ocorrência de apoptose nos túbulos seminíferos. Foram utilizados 24 camundongos distribuídos em quatro grupos: grupo 1 (G1) recebeu apenas água; grupo 2 (G2) recebeu dimetilsulfóxido (DMSO); grupos 3 (G3) e 4 (G4) receberam 300 e 400mg/kg de peso corporal do extrato de *Pfaffia glomerata*, respectivamente, diluídos em 0,2 mL de DMSO. Todos os grupos foram submetidos a uma restrição calórica leve (10%). A análise fitoquímica do EHRPG revelou a presença de flavonóides, taninos, triterpenos/esteroides e saponinas. Os animais tratados com 300 e 400mg/Kg de peso corporal do EHRPG apresentaram aumento na proporção da túnica própria e de lúmen e diminuição na proporção e no volume de epitélio seminífero, no diâmetro tubular e nos índices gonadossomático (IGS), tubulossomático (ITS) e da célula de Sertoli. Ambos os grupos apresentaram também alto índice apoptótico das células germinativas, aumento na proporção de patologias tubulares, além de diminuição no índice da célula de Sertoli e no número corrigido de espermátides arredondadas. O grupo 4 apresentou ainda diminuição na altura do epitélio seminífero, nos números corrigidos de espermátócitos primários em preleptóteno/leptóteno e em paquíteno, na capacidade total de suporte da célula de Sertoli e na produção espermática. Conclui-se que o tratamento com o EHRPG tem efeitos negativos para a espermatogênese de camundongos, já que produz alterações patológicas nas células de Sertoli e germinativas, induz a apoptose de células germinativas sendo que, na dose de 400mg/Kg de peso corporal, também foi capaz de reduzir a produção espermática.

1. INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas com finalidades terapêuticas, sendo seu uso popular propagado de geração em geração. Vários fatores contribuem para que as plantas medicinais ainda desempenhem na medicina moderna importante papel, como fornecimento de fármacos que dificilmente seriam obtidos via síntese química, fornecimento de compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos, e fonte de produtos naturais que podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (Robbers et al., 1996; Turolla e Nascimento, 2006). Apesar disso, poucos estudos são realizados para comprovar sua eficácia e segurança, havendo poucos dados de toxicidade pré-clínica, sendo a maioria das espécies medicinais utilizadas com base somente no seu uso popular bem estabelecido (Turolla e Nascimento, 2006).

A espécie *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae), utilizada na medicina popular brasileira e avaliada no presente estudo, é popularmente conhecida como fáfia, ginseng-brasileiro, para-tudo, suma, corrente, carango-sempré-viva, acônito, caxixe, batata-do-mato e ginseng-do-pantanal (Nicoloso et al., 2001; Otofugi, 2005; Silva et al., 2010). Suas raízes e folhas são usadas como afrodisíacos e estimulantes gerais, tranquilizantes, antirreumáticos, anti-inflamatórias, cicatrizantes internos e externos, melhoradoras da visão e da memória, dentre outras utilizações. Encontra-se distribuída em toda América do Sul tropical e subtropical, sendo que no Brasil ocorre principalmente no Paraná e Mato Grosso do Sul (Teske e Trentini, 2001), além de São Paulo, Paraná, Mato Grosso e Goiás (Neto et al., 2005; Silva et al., 2010), ao longo de formações florestais e campestres (Magalhães, 2000; Guerreiro et al., 2009).

As raízes de *P. glomerata* são ricas em saponinas triterpênicas, com importantes atividades farmacológicas. Destaca-se a β -ecdisona, uma saponina esteroideal, como seu principal componente (Figueiredo, 2002; Correia Júnior, 2003; Alves et al., 2006; Queiroga et al., 2008). Suas propriedades medicinais foram comprovadas como anti-inflamatório e analgésico (Neto et al., 2005; Queiroga et al., 2008), no processo de cicatrização de feridas da pele (Guerreiro et al., 2009; Silva et al., 2010) e no efeito protetor da mucosa gástrica (Otofugi, 2005), ação benéfica na aprendizagem e memória de ratos idosos em modelos crônicos (Marques, 1998), além de exibir atividade depressora do sistema nervoso central e efeito amnésico (De-Paris et al., 2000).

Apesar de ser uma espécie amplamente utilizada, não existem relatos sobre seus efeitos na reprodução. Várias plantas utilizadas na medicina popular com importantes propriedades farmacológicas possuem efeitos adversos para as funções reprodutivas masculinas em animais de laboratório e humanos, dentre elas *Ocimum sanctum* (Ahmed et al., 2002), *Azadirachta indica*, (Aladakatti e Ahamed, 2005), *Syzygium aromaticum* (Mishra e Singh, 2008), *Sarcostemma acidum* (Venma et al., 2002).

O testículo dos mamíferos é dividido em dois compartimentos: o intertubular, formado pelas células de Leydig, células do conjuntivo (macrófagos e fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos, e o tubular, formado pelos túbulos seminíferos, os quais são compostos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen (Russell et al., 1990b). No epitélio seminífero são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli, as quais interagem tanto física como bioquimicamente com as células espermatogênicas durante a gametogênese. As células de Sertoli são responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio seminífero, por secretar fluido para formar o lúmen tubular, participar do processo de espermição, realizar a fagocitose, permitir a movimentação de células ao longo do epitélio, secretar proteínas e regular o ciclo espermatogênico (França e Russell, 1998). As células de Sertoli são essenciais no epitélio seminífero para que o processo espermatogênico ocorra, e quando elas são afetadas por determinadas substâncias há sérias consequências ao longo do epitélio seminífero, podendo interferir na qualidade e/ou na quantidade dos espermatozoides produzidos (Creasy, 2001).

Diversos produtos, naturais e sintéticos, interferem na espermatogênese, sendo que os alvos podem ser as células de Sertoli e as células germinativas tubulares, incluindo os espermatozoides que podem ser afetados em sua morfologia ou motilidade. A presença de células germinativas apoptóticas, desprendidas e/ou infiltradas, ausência de lúmen tubular, ausência de espermátides alongadas, vacuolizações nas células de Sertoli, redução na altura do epitélio seminífero e do diâmetro tubular, tipos celulares avançados predominantes e formação de agregados celulares são alguns aspectos chaves para o exame histopatológico do epitélio seminífero (Russell et al., 1990b; Boekelheide, 2005).

A apoptose tem papel crucial no desenvolvimento celular, controlando o número de células, eliminando as células anormais e não funcionais e prevenindo o desenvolvimento de tumores (Thompson, 1995; Jacobson et al., 1997; Da Silva et al., 2010). É definida por características morfológicas e eventos bioquímicos que resultam na eliminação eficiente de células de um tecido sem desencadear uma a resposta

inflamatória (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980). Na espermatogênese normal de roedores e humanos as células germinativas em vários estádios de maturação morrem espontaneamente, a fim de manter um número adequado, pelo processo de apoptose (Kerr, 1992; Brinkworth et al, 1995; Blanco-Rodriguez e Martinez-Garcia, 1996; Lin et al, 1997a, b; Sinha Hikim et al, 1998; Kimura et al., 2003). Porém, a apoptose de células germinativas anormalmente acelerada pode conduzir a um desequilíbrio da proliferação celular e morte, resultando na insuficiência da espermatogênese, frequentemente quando os animais são expostos a substâncias tóxicas. O equilíbrio entre a proliferação de células germinativas, diferenciação e apoptose é crítico para a manutenção da espermatogênese, sendo que a ruptura da regulação de qualquer um desses processos pode desempenhar um papel chave na progressão da doença testicular induzida por agente tóxico (Richburg, 2000). Portanto, avaliar a condição apoptótica em túbulos seminíferos danificados histologicamente após a administração de uma determinada substância, pode ser útil para esclarecer um possível mecanismo de ação tóxica e para avaliar efeitos antiespermatogênicos, já que a apoptose acelerada interfere na produção espermática.

Desta forma, objetivou-se analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* sobre os túbulos seminíferos, avaliando percentuais de apoptose e a produção espermática de camundongos, através de análises morfológicas e morfométricas, além de investigar os grupos de metabólitos secundários presentes no extrato utilizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Coleta e preparação do extrato

A matriz de *Pfaffia glomerata* utilizada neste estudo foi obtida da coleção de Germoplasma de Plantas Medicinais da Embrapa /Cenargen (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia), Brasília, Distrito Federal e cultivada em estufas na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

A preparação do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* (EHRPG) e as análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. O extrato foi obtido a partir de 1,2 Kg da raiz moída, deixado em maceração por 24h com de álcool etílico 95% (solvente) e em seguida submetida à percolação com o mesmo solvente. Após extração exaustiva, o extrato foi levado ao evaporador rotativo e

em seguida a liofilização para completa remoção do solvente. O rendimento da extração foi de 10,35%.

2.2 - Prospecção fitoquímica

A análise fitoquímica qualitativa foi realizada empregando-se cromatofolhas de sílica gel F254 (Tabela 1). O EHRPG foi testado para a presença de alcaloides, antraquinonas, cardiotônicos, cumarinas, esteroides, flavonoides, saponinas e taninos utilizando-se reveladores e eluentes indicados por Wagner e Bladt (1996).

Tabela 1: Padrão, reveladores e eluentes utilizados para testar a presença de compostos químicos no extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*

Composto	Fase móvel	Padrão	Revelador
Alcalóides	Clorofórmio (25ml): metanol (5ml)	Quinina	Reagente de Dragendorff
Antraquinonas	éter (15ml): tolueno (15ml)	1,8-diidroxiantraquinona	Reagente de Borntraeger (KOH 5%)
Cardiotônicos	acetato de etila (24ml): metanol (4ml): água (2ml)	Digitoxina	Reagente de Kedde
Cumarina	clorofórmio (6ml): acetato de etila (24ml)	Benzopirona	KOH 5%
Triterpenos/esteróides	acetato de etila (23ml): metanol (12ml): água (3mL)	β – sitosterol	Reagente de Lieberman-Burchard
Flavonóides	acetato de etila (21ml): ácido fórmico (2ml): ácido acético (2ml): água (4ml)	Rutina	AlCl ₃
Saponinas	éter (15ml): tolueno (15ml)	18- β -glicirretínico	Anisaldeído sulfúrico
Taninos	tolueno (14ml): butanol (7ml): ácido acético (7ml): água (2ml)	Ácido pirogálico	Reagente de Barton

2.3 – Tratamento

Foram utilizados 24 camundongos BALB/c em idade reprodutiva (50 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram pesados, divididos em 4 grupos de 6 indivíduos cada e colocados em gaiolas coletivas. Todos os animais foram submetidos a uma restrição calórica leve (10%). O tratamento foi feito por gavagem e os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 24°C e luminosidade de 12 horas. Animais do grupo 1 (G1) receberam apenas água e os do grupo 2 (G2) receberam DMSO. Os animais dos grupos 3 (G3) e 4 (G4) receberam EHRPG nas doses de 300 e 400mg/kg de peso corporal, respectivamente, diluídos em 0,2 mL de DMSO. A fase de tratamento teve duração de 42 dias consecutivos, sendo os animais avaliados nas suas condições biométricas e eutanasiados ao final do período de tratamento.

2.4 - Coleta de amostras e microscopia de luz

Os procedimentos experimentais seguiram as determinações da Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sendo aprovado sob o protocolo N° 67/2010.

Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados através de inalação de CO₂. Em seguida, os testículos foram removidos e fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965).

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. Para realização da reação de TUNEL, fragmentos dos testículos foram desidratados em série etanólica crescente e preparados para inclusão em Paraplast® (Sigma). Imagens dos túbulos seminíferos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

2.5 - Biometrias corporal e testicular

Os testículos foram pesados após fixação em balança de precisão (BEL Mark 160/0,0001g). Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos

pesos corporal e testicular, foi calculado o índice gonadossomático (IGS), a partir da fórmula $IGS = PG/PC \times 100$, onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal.

2.6 - Análise morfométrica dos testículos

2.6.1 - Proporções volumétricas, volume dos componentes do testículo e índice tubulossomático

As proporções volumétricas de túbulo e intertúbulo foram estimadas a partir da contagem de 2.660 pontos projetados sobre imagens capturadas utilizando objetiva de 10X, totalizando 10 campos aleatórios, nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Para cálculo dos volumes de epitélio seminífero, túbulo e intertúbulo utilizou-se a fórmula: Volume = % de epitélio seminífero, % túbulo ou intertúbulo/100 x peso do parênquima de 1 testículo.

Baseado nos volumes 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 se entende que a densidade testicular está próxima de 1 em mamíferos (Johnson et al., 1981; Tae et al., 2005; Costa et al., 2011).

2.6.2 - Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

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. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a partir da túnica própria até o lúmen tubular.

2.6.3 - 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 e Courot, 1963; Dorst e Sajonski, 1974): $CT = VTS/\pi R^2$, onde VTS = volume

total de túbulos seminíferos; πR^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 = Comprimento total de túbulos (m) /Peso bruto dos testículos (g).

2.6.4 - 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 (Curtis e Aman, 1981; Swierstra, 1968; Courot et al., 1970; Ortavant et al., 1977; Amann e Schanbacher, 1983) foi feita a partir da contagens 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):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{(\text{DM}/2)^2 - (\text{DM}/4)^2}}$$

Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celular estudados, para cada animal, em aumento de 400x. Para a espermatogônia do tipo A, que apresenta núcleo ovoide, 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 e Almquist, 1962).

2.6.5 - 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:

- ▶ espermátocitos primários em preleptóteno/leptóteno: espermatogônias do tipo A, obtendo-se o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
- ▶ espermátides arredondadas: espermatogônias do tipo A, obtendo-se o rendimento geral da espermatogênese;
- ▶ espermátides arredondadas: espermátocitos 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.

2.6.6 - Número de células de Sertoli por testículo

Esta estimativa 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, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de Reviers e Lincoln (1978):

$$\text{Número de células de Sertoli por testículo} = \frac{\text{Comprimento total de túbulos seminíferos por testículo } (\mu\text{m}) \times \text{Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal}}{\text{Espessura do corte } (\mu\text{m})}$$

A partir desse cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

2.6.7 - Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo

A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo foi estimada de acordo com a seguinte fórmula desenvolvida por Amann, (1970):

$$\text{PED} = \frac{\text{Volume total do túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times \text{Número corrigido de espermátides arredondadas}}{\text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero } (\mu\text{m}^2) \times \text{espessura do corte histológico } (\mu\text{m})}$$

A duração do ciclo do epitélio seminífero em camundongos é de nove dias (Russell et al., 1990a), sendo uma constante biológica espécie-específica.

2.7 - 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. Foram considerados túbulos com patologias aqueles que apresentavam qualquer alteração segundo Russell et al. (1990b), Creasy (2001) e Boekelheide (2005). As alterações foram classificadas 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, apoptose fisiológica (AF);

Nível 2: Túbulos seminíferos apresentando vacúolos uni e multivesiculares nas células de Sertoli e desprendimento celular, AF;

Nível 3: Células espermatogênicas no interior do lúmen, presença de células gigantes e em processo de degeneração, apoptose acentuada (AA);

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

Nível 5: Túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas, em estado irreversível de degeneração.

2.8. Técnica de TUNEL

A técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) foi realizada de acordo com o protocolo do kit QIA 33 (Calbiochem). Os cortes dos tecidos foram desparafinados e hidratados em álcool etílico, incubados com proteinase K 1% (20 minutos em temperatura ambiente), lavados em água destilada e incubados com peróxido de hidrogénio 3% em metanol durante 5 minutos. As lâminas foram incubadas com tampão de equilíbrio em câmara úmida em temperatura ambiente durante 20 minutos e, subsequentemente, com Tdt enzima durante uma hora (37°C). As células imunorreativas foram detectadas por incubação com 3,3-diaminobenzidina tetracloreto (DAB) e peróxido de hidrogênio, durante 13 minutos numa câmara úmida escura. As seções foram contrastadas com hematoxilina, desidratadas em etanol, diafanizadas em xileno e montadas. Os núcleos apoptóticos foram coradas em marrom. Lâminas extras do mesmo material foram utilizadas como controles negativos e positivos, sendo que as lâminas destinadas ao controle positivo foram incubadas com DNase (1.500 U/ul) durante 10 minutos, antes do bloqueio do processo com a peroxidase endógena. Para as lâminas do controle negativo não foi utilizada na reação a Tdt enzima. Uma lâmina por grupo foi corada ao mesmo tempo, evitando discrepâncias na análise dos resultados.

2.8.1. Índice apoptótico

O índice apoptótico foi calculado a partir da contagem do número de núcleos de células germinativas marcados pela técnica TUNEL, dividido pela soma de núcleos marcados e não marcados, por secção transversal de túbulo seminífero. Foram avaliadas 20 secções transversais de túbulos seminíferos por animal e utilizados 3 animais por grupo. Foram considerados como núcleos apoptóticos aqueles que apresentaram coloração marrom e cromatina densa de acordo com Gomes et al., (2011).

3. Análises estatísticas

Os parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p < 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1 - Prospecção fitoquímica

Ainda que se saiba a constituição fitoquímica básica de *P. glomerata* é importante a confirmação desses componentes no extrato utilizado. Assim, a análise fitoquímica do EHRPG confirmou a presença de flavonoides, taninos, triterpenos/esteroides e saponinas. Os grupos alcaloides, antraquinonas, cardiotônicos e cumarinas não foram evidenciados no extrato.

4.2 - Biometrias corporal e testicular

Os dados biométricos encontram-se dispostos na Tabela 2. Observou-se aumento no peso corporal e diminuição no IGS dos grupos animais tratados com as duas dosagens do extrato.

4.3 - Análises morfométricas dos testículos

Houve aumento na proporção da túnica própria e do lúmen e diminuição na proporção e no volume de epitélio seminífero nos animais dos grupos G3 e G4 em relação aos grupos controles (Tabela 3). A proporção de túbulos seminíferos sofreu redução no grupo que recebeu 300mg/Kg do extrato em relação a G1 e G2 (Tabela 3). O diâmetro tubular e o ITS sofreram redução, enquanto que o comprimento total de túbulo, por testículo e por grama de testículo, aumentou nos dois grupos que receberam o extrato (Tabela 4). A altura do epitélio seminífero diminuiu apenas no grupo que recebeu 400mg/Kg do EHRPG em relação a G1 e G2 (Tabela 4).

Os números corrigidos de PL/L e PAQ sofreram redução nos testículos dos animais que receberam a maior concentração do extrato, comparados com G1 e G2 e com G1, G2 e G3, respectivamente (Tabela 5). O número corrigido de espermatídes arredondadas também diminuiu nos dois grupos tratados, comparado com os controles sendo mais acentuado no grupo G4 (Tabela 5).

Os dados referentes à morfometria da célula de Sertoli e a produção espermática diária (PED) encontram-se na Tabela 6. O índice da célula de Sertoli diminuiu de forma progressiva à medida que a concentração do extrato aumentou, apresentando diferença também entre os grupos tratados. A capacidade total de suporte e a PED sofreram redução no G4 em relação aos demais grupos.

4.4 - Análises quantitativas e qualitativas histopatológicas

Os animais tratados com água e DMSO apresentaram apenas alguns túbulos contendo pequenos vacúolos univesiculares, estando os túbulos íntegros com as células germinativas bem preservadas e epitélio seminífero bem organizado determinando um arranjo normal (Figuras 1A e 1B). Estes dois grupos enquadraram-se no nível 1 de classificação histopatológica, pois os vacúolos univesiculares em baixa proporção podem ocorrer em indivíduos saudáveis. Animais que receberam o EHRPG na concentração de 300mg/Kg de peso corporal apresentaram vacúolos uni e multivesiculares nas células de Sertoli, além de descamação de células germinativas oriundas do ambiente adluminal para o lúmen tubular, enquanto as células do ambiente basal permaneceram em seu sítio de localização juntamente com as células de Sertoli (Figuras 1C e 1D). A presença de células germinativas multinucleadas, formando células gigantes (Figuras 2A e 2B), células germinativas em processo de degeneração (Figuras 2C e 2D), lúmen aumentado devido à perda de células adluminais (Figuras 2D e 3A) e túbulos atrofiados, alguns contendo apenas células de Sertoli e espermatogônias (Figuras 3B, 3C e 3D), foram detectadas nos animais que receberam as duas concentrações do extrato. Quando a dosagem foi de 400mg/Kg, as patologias apresentaram-se mais severas, sendo observados túbulos com perda total de todas as células germinativas e de Sertoli, configurando um estado irreversível de degeneração (Figura 3D). Animais do grupo 3 enquadraram-se principalmente nos graus 1, 2, 3 e 4 da classificação patológica proposta neste trabalho, enquanto que os do G4 atingiram também o nível 5.

A proporção de túbulos seminíferos patológicos aumentou nos animais que receberam o EHRPG em relação aos animais controles (Figura 4).

4.5. Índice apoptótico

As Figuras 5 e 6 mostram o aumento no número de células germinativas em apoptose associado ao aumento da dose do extrato. O índice apoptótico nos grupos que receberam os extratos, em ambas as concentrações, foi significativamente maior em relação aos grupos controles, variando também entre os tratados (Figura 6). As médias foram de $0,003 \pm 0,00$ para G1 e G2, contra $0,156 \pm 0,00$ e $0,405 \pm 0,07$ para G3 e G4, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

No extrato hidroalcoólico da raiz de *Pffafia glomerata* foi confirmada a presença de saponinas e triterpenos. As saponinas são apontadas como os constituintes ativos do ginseng, das espécies *Pffafia paniculata* e *Panax ginseng*, ambas utilizadas popularmente como afrodisíacos, assim como a espécie em estudo (Kim et al., 1998; Arletti et al., 1999). Na raiz de *Pffafia paniculata* estão presentes as saponinas triterpênicas, cuja administração reduziu a proliferação celular e aumentou a apoptose no fígado de camundongos, sendo seu uso sugerido como antitumoral (da Silva et al., 2010). Essas saponinas também estão presentes em outras espécies vegetais, sendo usadas para combater o desenvolvimento de neoplasias por indução de apoptose (Li et al., 2005; Lemeshko et al., 2006; da Silva et al., 2010). As saponinas encontradas na raiz de *P. glomerata* mostraram efeito inibidor da melanogênese de células em cultura (Nakamura et al., 2010). Possivelmente, a ação dessas saponinas presentes no EHRPG sobre o testículo levou a apoptose acelerada, ocasionando acentuada morte de células germinativas nas duas doses administradas e causando alterações patológicas tubulares.

A redução do IGS nos animais tratados reflete a ação do extrato sobre as gônadas. Essa redução também foi observada em animais que receberam o extrato de *Stephania hernandifolia* (Ghosh et al., 2002), tendo um efeito dose-dependente, assim como no presente estudo. Por outro lado, animais que receberam os extratos de *Heteropterys aphrodisiaca*, *Anemopaegma arvense* (Chieregatto, 2005) *Tynnanthus fasciculatus* (Melo et al., 2010) e *Rudgea viburnoides* (Monteiro et al., 2012), não apresentaram alterações nesse parâmetro.

O aumento na proporção de túnica própria nos animais tratados com as duas doses do extrato foi reflexo da maior espessura observada nesse local. Aumento semelhante foi também evidenciado nos testículos de ratos submetidos ao tratamento com arsênio na forma de arsenato de sódio, na concentração $1,0\text{mg L}^{-1}$, durante 84 dias (Carvalho, 2009), sendo, segundo o autor uma tentativa de proteção contra a ação tóxica da substância administrada. Além disso, o aumento da espessura da túnica própria pode interferir na relação parácrina entre túbulo e intertúbulo levando a alterações no epitélio germinativo, como foi evidenciado por Adam et al. (2011a, b). Esses autores observaram que altos níveis de decorina, um componente da matriz extracelular da parede dos túbulos seminíferos, leva ao aumento do tecido peritubular e pode causar um desequilíbrio nas vias de sinalização parácrina, inibindo a função gametogênica testicular. A testosterona parácrina é importante por estimular o ciclo espermato gênico,

agindo indiretamente sobre as células de Sertoli, as quais expressam receptores para esse andrógeno (Griswold e McLean, 2006). No presente estudo, o aumento na espessura da túnica própria possivelmente afetou a comunicação entre túbulo e intertúbulo, comprometendo assim o processo espermatogênico.

Como os túbulos seminíferos são os principais componentes testiculares, em pesquisas envolvendo parâmetros reprodutivos masculinos, a medida do diâmetro tubular e a altura do epitélio constituem uma abordagem utilizada como indicador da atividade espermatogênica (França e Russell, 1998; Paula et al., 2002). O epitélio seminífero é o principal componente tubular formado pelas células germinativas em associações com as células de Sertoli. A quantificação da proporção e volume do epitélio é, portanto, um dado que reflete a atuação positiva ou negativa dando uma ideia geral da substância administrada sobre o processo espermatogênico. No presente estudo, a diminuição do diâmetro tubular e da altura, proporção e volume do epitélio seminífero após o tratamento com o EHRPG demonstra que o extrato causa efeitos negativos para atividade espermatogênica dos camundongos. O aumento na proporção de lúmen, associado à diminuição na proporção de epitélio nos dois grupos que receberam o EHRPG, se relaciona diretamente com a diminuição de espermátides arredondadas que ambos apresentaram.

O ITS é um dado que visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal. Esse índice diminuiu nos animais tratados com as duas dosagens do EHRPG. Contrariamente, ratos que receberam o extrato de *Tynnanthus fasciculatus* (Melo et al., 2010), na dose de 200mg/Kg de peso corporal, apresentaram aumento significativo no ITS em relação ao grupo que recebeu a dose de 100mg/Kg, indicando, segundo o autor, um aumento dose-dependente desse com maior investimento corporal na produção espermática. No presente estudo, esse investimento em produção espermática diminuiu à medida que a concentração do extrato aumentou.

A vacuolização nas células de Sertoli é o primeiro sinal morfológico de danos tubulares antecedentes as alterações nas células germinativas, mostrando que as células de Sertoli são o local primário de ação de substâncias tóxicas nos testículos (Creasy, 2011; Boekelheide, 2005). As vacuolizações são decorrentes de dilatações no retículo endoplasmático, presente em grande quantidade nestas células. Assim como no presente estudo, ratos que receberam extrato de *Opuntia dillenii* apresentaram vacuolizações nas células de Sertoli, associadas à descamação de células germinativas (Bajaj e Gupta, 2012). Provavelmente as células de Sertoli são mais afetadas por agentes químicos

porque estas substâncias passam necessariamente por elas, antes de atingirem as células germinativas mais avançadas (Russell et al., 1990b; Greaves, 2007). Por exercer também papel vital na regulação da espermatogênese, qualquer disfunção nas células de Sertoli pode resultar em alterações e/ou degenerações das células germinativas, levando até mesmo à infertilidade. Estas afirmações foram comprovadas no presente estudo, pois animais que receberam 300mg/Kg do EHRPG apresentaram vacuolização uni e multivesiculares de células de Sertoli, e estas, juntamente com as células germinativas iniciais, permaneceram no ambiente basal. Já as células do ambiente adluminal encontraram-se desorganizadas e frequentemente descamadas, o que indica uma ação direta do extrato sobre as células de Sertoli, sem atingir a barreira hematotesticular (Figura 1D). Embora sejam na maioria das vezes o sítio primário de injúrias, as células de Sertoli raramente se desprendem do epitélio seminífero, a não ser que os túbulos tenham atingido um grau máximo de resposta após a administração de uma substância (Russell et al., 1990b). Nos animais tratados com 300mg/Kg de peso corporal do EHRPG, as células de Sertoli permaneceram no seu sítio de localização, porém naqueles que receberam 400mg/Kg um percentual razoável de seminíferos túbulos atingiram um grau máximo de resposta patológica, não apresentando células germinativas ou de Sertoli. Assim, entendemos que nesses casos a barreira hematotesticular foi também atingida.

A atrofia tubular e a degeneração de células germinativas são alguns dos resultados da administração de substâncias que interferem nos microtúbulos das células de Sertoli. A secreção de fluido do túbulo seminífero é uma função dessa célula, e o mecanismo de formação do fluido é dependente dos microtúbulos. A viabilidade das células germinativas adluminais depende da provisão de fatores hormonais e nutricionais presentes no fluido do túbulo, e a destruição do fluido secretório é um mecanismo pelo qual a disfunção da célula de Sertoli poderia resultar em degeneração das células germinativas e consequente atrofia tubular (Russell et al., 1990b; Boekelheide, 2005). A presença de células em processo de degeneração e túbulos atrofiados (Figuras 2C, 2D, 3B, 3C e 3D) sugere que o EHRPG interfere no citoesqueleto das células de Sertoli.

A presença de células gigantes, como as demonstradas nas figuras 2A e 2B, é relatada em casos onde drogas anticancerígenas causam a desestabilização de microtúbulos que mantêm a integridade de conexões entre as células germinativas (pontes citoplasmáticas), ou ainda resultam em uma divisão meiótica anormal (Russell

et al., 1990b; Greaves, 2007). Neste trabalho, tanto as células mais próximas da base do túbulo, como os espermatócitos secundários, provenientes da primeira divisão meiótica, quanto as espermátides resultantes da segunda divisão meiótica, formaram células gigantes. Nesses casos, ou o fuso não foi desfeito para que houvesse separação das células, ou as células perderam as conexões que as mantinham unidas. Esses dados mostram mais uma vez a ação negativa do EHRPG sobre a integridade dos microtúbulos. Camundongos que receberam o extrato de *Carthamus tinctorius* também apresentaram células gigantes nos túbulos seminíferos, associado com vacuolizações e desprendimento de células germinativas, tendo o extrato efeitos tóxicos para a porção gametogênica testicular (Mirhoseini et al., 2012).

Assim como no presente estudo, camundongos que receberam o extrato de *Syzygium aromaticum*, planta utilizada como afrodisíaco, apresentaram aumento na proporção de túbulos seminíferos patológicos, com vacuolizações em células de Sertoli e degeneração de várias células germinativas (Mishra e Singh, 2008). Esses achados indicam que um determinado extrato pode ter seu potencial afrodisíaco, e ao mesmo tempo, interferir de forma negativa nas células espermatogênicas, podendo causar até mesmo uma infertilidade, daí a importância do estudo das plantas de uso popular.

A análise funcional do processo espermatogênico, a estimativa da produção espermática e o conhecimento da cinética espermatogênica são possíveis de serem conhecidos por meio da quantificação dos diferentes tipos de células germinativas e de células de Sertoli por secções transversais de túbulos seminíferos nos diversos estádios do ciclo (Clermont, 1972; França, 1991). Os animais tratados com 400mg/Kg do EHRPG apresentaram diminuição no número de espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno e paquíteno e no número de espermátides arredondadas, sendo que esse último parâmetro citado apresentou-se diminuído também nos animais que receberam a concentração de 300mg/Kg de peso corporal do extrato. Essa diminuição refletiu na taxa de PED apenas dos animais do grupo 4. Camundongos que receberam o extrato de *Syzygium aromaticum* em uma menor concentração também apresentaram alterações qualitativas tubulares, porém somente nas concentrações mais elevadas do extrato é que estas foram mais evidentes, levando a alterações quantitativas e causando diminuição na PED (Mishra e Singh, 2008). Segundo Russell et al. (1990b), as células de Sertoli são capazes de detectar anormalidades qualitativas nas células germinativas, podendo fagocitá-las, eliminando todas ou unicamente algumas células defeituosas da população celular. O resultado final é uma alteração quantitativa que se reflete no

número de espermatozoides produzidos. Esse fenômeno foi demonstrado no presente estudo, nos animais que receberam a maior dose do extrato. Apesar dos animais do grupo G3 não terem apresentado uma diminuição significativa da PED, alterações qualitativas nos túbulos seminíferos foram evidenciadas, sendo assim, os espermatozoides liberados a partir de células potencialmente defeituosas, poderiam apresentar características anormais, o que pode comprometer o processo de fertilização.

A capacidade total de suporte da célula de Sertoli (número de células germinativas suportadas por uma célula de Sertoli), assim como seu índice (razão espermatide : célula de Sertoli) são os melhores reflexos da eficiência funcional dessa célula, além de serem parâmetros altamente correlacionados com a produção espermática (França e Russell, 1998; Hess e França, 2005). A capacidade total de suporte e o índice de célula de Sertoli diminuíram no grupo que recebeu 400mg/Kg do EHRPG, tendo o segundo parâmetro diminuído também nos animais que receberam 300mg/kg do extrato.

Nos testículos dos mamíferos adultos, a supressão de um subconjunto de células germinativas testiculares por apoptose ocorre normalmente (Allan et al., 1992; Bartke, 1995; Billig et al., 1995) e trata-se de um importante mecanismo fisiológico para limitar a população de células germinativas a números que a célula de Sertoli possa suportar (Allan et al, 1992;. Bartke, 1995; Billig et al, 1995;. Sinha Hikim et al, 1995; Richburg, 2000). Porém, além da apoptose fisiológica, aumentos maciços na apoptose de células germinativas são observados após o tratamento de animais de laboratório expostos a substâncias observando-se como resultado, várias formas de prejuízos físico ou químico para os testículos (Richburg, 2000; Li et al., 2009). A raiz de *Pffafia glomerata* levou a apoptose acelerada provocando a perda de células germinativas nas duas doses administradas e a uma baixa produção espermática nos animais que receberam 400mg/Kg do extrato. Assim como no presente estudo, ratos que receberam o extrato de *Centella asiatica*, também apresentaram alto índice apoptótico levando a perda de células germinativas (Heidari et al., 2012). Esses dados comprovam que o EHRPG afetou primeiramente o funcionamento das células de Sertoli, o que foi evidenciado pela presença de vacúolos, além da diminuição da capacidade de suporte e da eficiência destas células, o que afetou a qualidade e quantidade de células germinativas adluminais por um processo apoptótico acelerado, levando a uma baixa PED nos animais que receberam 400mg/Kg de peso corporal do EHRPG.

Segundo Kimura et al., (2003), dependendo da causa do distúrbio na espermatogênese, o potencial apoptótico para manter um número adequado de células germinativas pode ser regulado de forma diferente, tendo ou não relevância clínica. No presente estudo, pode-se afirmar que a maior dose do EHRPG ocasionou importante relevância clínica, levando à diminuição da produção espermática e a um possível quadro de infertilidade, já que as patologias do nível 5 têm características de serem irreversíveis.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata*, nas doses de 300 e 400mg/Kg de peso corporal, teve efeitos negativos para a espermatogênese de camundongos, produzindo alterações patológicas nas células de Sertoli e nas células germinativas, com alto índice de células germinativas apoptóticas. Na dose de 400mg/Kg de peso corporal, estas alterações foram mais severas, sendo capazes de reduzir a produção espermática de forma irreversível. Os resultados negativos para a espermatogênese foram, na maioria das vezes, dose dependentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat* 1946;94: 238-248.

Adam M, Urbanski HF, Garyfallou VT, Welsch U, Kohn FM, Ullrich Schwarzer J, Strauss L, Poutanen M, Mayerhofer A. High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function. *Int J Androl* 2011;1-12a.

Adam M, Schwarzer JU, Kohn FM, Strauss L, Poutanen M, Mayerhofer A. Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Human Rep* 2011;26:2613-2625b.

Aladakatti RH, Ahamed RN. Changes in Sertoli cells of albino rats induced by *Azadirachta indica* A. Juss leaves. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2005;16:67-80.

Allan D, Harnon B, Roberts S. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 1992;25:241-250.

Alves RBN, Mendes RA, Mendes MA, Carneiro RMDG, Silva DB, Cardoso LD, Salomão NA, Vieira RF. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germoplasm conservation. *Rev Bras Pl Med* 2006;8:1-4.

Amann RP, Almquist JO. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J Dairy Sci* 1962;45:774-781.

Amann RP, Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci* 1983;57:380-403.

Amann RP. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertil Steril* 1970;21:662-672.

Ahmed M, Ahamed RN, Aladakatti RH, Ghosesawar MG. Reversible anti-fertility effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on sperm parameters and fructose content in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology* 2002;13:51-59.

Arletti R, Benelli A, Cavazzuti E, Scarpetta G, Bertolini A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology* 1999;143:15-19.

Attal J, Court M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1963;3:219-241.

Bajaj VK, Gupta RS. Fertility suppression in male albino rats by administration of methanolic extract of *Opuntia dillenii*. *Andrologia* 2012; 44:530-537.

Bartke A. Apoptosis of male germ cells, a generalized or cell type-specific phenomenon. *Endocrinology* 1995;136:3-4.

Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995;136:5-12.

Boekelheide, K. Sertoli Cell Toxicantes. In: Skinner MK, Griswold MD (eds). *Sertoli Cell Biology*. San Diego: Elsevier;2005:345-382

Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996;29:13-31.

Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 1995;105:25-33.

Carvalho FAR. Morfologia e morfologia testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica ao arsenato. Viçosa:UFV;2009;76p (Dissertação, mestrado).

Chieregatto, LC. Efeito do Tratamento Crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. Viçosa: UFV;2005;67p (Dissertação, mestrado).

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972;52:198-236.

Correia Júnior C. Estudo Agrônômico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): Sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul. Botucatu: UNESP/FCA;2003;94p, (Tese, doutorado).

Costa KLC, Matta SLP, Gomes MLM, Paula TAR, Freitas KM, Carvalho FAR, Silveira JA, Dolder H, Mendis-Handagama SLMC. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim Repr Sci* 2011;127:202-212.

Courot M, Hochereau-de-Reviers MT, Ortavant R. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandenmark NL (eds). *The testis*. New York: Academic Press;1970;p:339-432.

- Creasy DM. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. Toxic Pathol 2001;29:64-76.
- Curtis SK, Amann RP. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. J Anim Sci 1981;53:1645-1657.
- da Silva TC, Cogliatta B, Silva AP, Fukumasu H, Akisue G, Nagamine MK, Matsuzaki P, Haraguchi M, Gorniaka SL, Dagli MLZ. *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) roots decrease proliferation and increase apoptosis but do not affect cell communication in murine hepatocarcinogenesis. Exp Toxicol Pathol 2010;62:145-155.
- De-Paris F, Neves G, Salgueiro JB, Quevedo J, Izquierdo I, Rates SMK. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. J Ethnopharmacol 2000;73:261-269.
- Dorst VJ, Sajonski H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklung. Monatsh Ver Med 1974;29: 650-652.
- Figueiredo, LS. Avaliação do comportamento em cultivo de campo *in vitro* de indivíduos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). Campos dos Goytacazes: UENF; 2002;60p (Tese, doutorado).
- França LR. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG;1991;180p (Tese, doutorado).
- França LR., Russell LD. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F and Regadera J (eds). Male reproduction- a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications;1998;p:198-219.
- Gomes MLM, Monteiro JC, Freitas KM, Sbervelheri MM, Dolder H. Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenic advantages. Biol Res 2011;44:235-241.
- Ghosh D, Jana D, Debnath JM. Effects of leaf extract of *Stephania hernandifolia* on testicular gametogenesis and androgenesis in albino rats: a dose-dependent response study. Contraception 2002;65:379-384.

Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. 3rd ed. Elsevier: New York;2007;960p.

Griswold MD, McLean D. The Sertoli Cell. In: Chales JRG, Pfaff DW, Plant TM, Kretser DM, Richards JS, Wassarman PM (eds). Physiology of Reproduction. San Diego: Elsevier;2006:949-975.

Guerreiro CPV, Marques MOM, Ferracini VL, Queiroz SCN, Ming LC. Produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função da adubação orgânica em 6 épocas de crescimento. Rev Bras Pl Med 2009;11:392-398.

Heidari M, Heidari-Vala H, Sadeghi MR, Akhondi MM. The inductive effects of *Centella asiatica* on rat spermatogenic cell apoptosis in vivo. J Nat Med 2012;66:271-278.

Hess RA, França LR. Structure of the Sertoli Cell. In: Skinner MK, Griswold MP (eds). Sertoli Cell Biology. San Diego:Elsevier; 2005;p:19-40.

Hochereau-de-Reviere MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. J Reprod Fertil 1978;54:209-213.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death review in animal development. Cell 1997;88:347-54.

Johnson L, Petty CS, Neaves WB. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. Biol Reprod 1981;25:217-226.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 1965;27:137-138.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-257.

Kim HJ, Woo DS, Lee G, Kim JJ. The relaxation effects of ginseng saponin in rabbit corporal smooth muscle: is it a nitric oxide donor? Br J Urol 1998;82: 744-748.

Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl* 2003;24:185-191.

Lemeshko VV, Haridas V, QuijanoPerez JC, Gutterman JU. Avicins, natural anticancer saponins, permeabilize mitochondrial membranes. *Arch Biochem Biophys* 2006;454:114-22.

Lin WW, Lipshultz LI, Lamb DJ, Kim ED, Wheeler TM. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997a;68:1065-1069.

Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI, Kim ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic stages. *J Urol* 1997b;158:1791-1793.

Li YJ, Song TB, Cai YY, Zhou JS, Song X, Zhao X, Wu XL. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci* 2009;108:427-436.

Li XX, Davis B, Haridas V, Gutterman JU, Colombini M. Proapoptotic triterpene electrophiles (Avicins) form channels in membranes: cholesterol dependence. *Biophys J* 2005;88:2577-84.

Magalhães PM. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: Bernal JVM (ed.). *Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas*. Santafé de Bogotá: Cyted;2000;p:323-332.

Marques, LC. Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen- *Amaranthaceae*. São Paulo: UFSP;1998;145p (Tese, doutorado).

Mirhoseini, M, Mohamadpour, M, Khorsandi, L. Toxic effects of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) extract on mouse spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:457-461.

Melo FCSA, Matta SLP, Paula TAR, Gomes MLM, Oliveira LC. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. Biol Res 2010;43:445-450.

Mishra RK, Singh SK. Safety assessment of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) extract with respect to testicular function in mice. Food Chem Toxicol 2008;46:3333-3338.

Monteiro JC, Matta SLP, Predes FS, Paula TAR. Testicular morphology of adult Wistar rats treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. leaf infusion. Brazilian Archives of Biology and Technology 2012;55:101-105.

Nakamura S, Chen G, Nakashima S, Matsuda H, Pei Y, Yoshikawa M. Brazilian Natural Medicines. IV. New Noroleanane-Type Triterpene and Ecdysterone-Type Sterol Glycosides and Melanogenesis Inhibitors from the Roots of *Pfaffia glomerata*. Chem Pharm Bull 2010;5:690-695.

Neto AG, Costa JMLC, Belatia CC, Vinhólis AHC, L.S. Possebom, Da Silva Filho AA, Cunha WR, Carvalho JCT, Bastos, JK, Silva MLA. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. J. Ethnopharmacol 2005;96: 87-91.

Nicoloso FT, Erig AC, Martins CF, Russowski D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. Rev Bras Plant Med 2001;2:11-8.

Otofugi GM. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Curitiba: UFP;2005;177p (Dissertação, mestrado).

Ortavant R, Courot M, Hochereau-de-Reviere MT. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PT (eds). Reproduction in domestic animals. New York: Academic Press; 1977;p:203-227.

Paula TAR, Costa DS, Matta SLP. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. Biosci J 2002;18:121-136.

Queiroga CL, Salandin M, Filho AAS, Bastos JK, Filho EAS, Montanari I, Catharino R, Eberlin MN. Atividade anti-inflamatória de saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química;2008;p1241-1242.

Richburg JH. The relevance of spontaneous- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. Toxicology 2000;113:79–86.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Williams & Wilkins;1996;p:1-14.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Histopathology of the testis. In: Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida: Cache River Press;1990;p:210-266b.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida: Cache River Press;1990;p:1-40a.

Silva MI, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Nassif PAN, Ribas MM, Varaschim M, Czezko LE. A utilização da *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele. Arq Bras Cir Dig 2010;4:228-233.

Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology 1995;136:2770-2775.

Sinha Hikim APS, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:152-155.

Swierstra EE. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoa transit through the epididymis. Anat Rec 1968;161:171-186.

Tae HJ, Jang BG, Ahn DC, Choi EY, Kang HS, Kim NS, Lee JH, Park SY, Yang HH, Kim IS. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus*

colchicus karpowi) during the breeding and non-breeding seasons. Vet Res Comm 2005;7:629-643.

Teske M, Trentini AM. Herbarium: compêndio de fitoterapia. 4 nd ed. Curitiba: Herbarium Laboratório;2001;p:317.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-62.

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Rev Bras Cienc Farm 2006;42:289-306.

Venma PK, Sharma A, Mathur A, Sharma P, Gupta RS, Joshi SC, Dixit VP. Effect of *Sarcostemma acidum* stem extract on spermatogenesis in male albino rats. Asian Journal of Andrology 2002;4: 43-47.

Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer: Berlin; 1996;p384.

Wyllie A, Kerr J, Curie A. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980;68:251-306.

Tabela 2. Peso corporal (PC), peso testicular (PT), índice gonadosomático (IGS) e peso do parênquima testicular (PPT) de camundongos adultos tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
PC (g)	22,00 ± 1,65 ^a	22,78 ± 1,51 ^{ab}	25,11±3,08 ^b	25,34± 2,33 ^b
PT (g)	0,19 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,04 ^a
IGS (%)	0,87 ± 0,12 ^a	0,87 ± 0,02 ^a	0,72 ± 0,06 ^b	0,64 ± 0,15 ^b
PPT (g)	0,17 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,15±0,03 ^a

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Tabela 3: Proporção volumétrica de túnica própria (TP), de lúmen (L), proporção (PES) e volume de epitélio seminífero (VES), proporção de túbulos seminíferos (TS) de camundongos adultos tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
TP (%)	3,73 ± 0,39 ^a	3,66 ± 0,65 ^a	5,37 ± 0,76 ^b	5,74 ± 0,36 ^b
L (%)	10,23 ± 0,95 ^a	10,09 ± 1,96 ^a	23,94 ± 3,55 ^b	23,38 ± 2,75 ^b
PES (%)	81,09 ± 0,95 ^a	81,18 ± 2,30 ^a	63,26 ± 1,45 ^b	65,04 ± 1,39 ^b
VES (mL)	0,14 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,02 ^b
TS (%)	95,05 ± 1,06 ^a	94,93 ± 0,81 ^a	92,57 ± 2,60 ^b	94,15 ± 0,80 ^{ab}

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Tabela 4: Diâmetro tubular (DT), altura do epitélio seminífero (AES), volume tubular (VT), índice tubulossomático (ITS), comprimento total de túbulos seminíferos por testículo (CTT) e comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo (CTT/g) de camundongos adultos tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
DT (µm)	213,14 ± 5,2 ^a	222,81 ± 2,40 ^a	199,12 ± 5,90 ^b	199,17 ± 10,6 ^b
AES (µm)	71,28 ± 4,21 ^a	69,46 ± 6,74 ^a	67,89 ± 3,71 ^{ab}	63,45 ± 6,10 ^b
VT (mL)	0,16 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,00 ^a
ITS (%)	0,74 ± 0,10 ^a	0,75 ± 0,02 ^a	0,59 ± 0,01 ^b	0,55 ± 0,01 ^b
CCT(m)	4,55 ± 0,53 ^{ab}	3,34 ± 0,99 ^a	4,79 ± 0,42 ^b	4,50 ± 0,31 ^b
CTT (m/g)	24,03 ± 1,34 ^a	21,01 ± 0,28 ^b	26,82 ± 1,53 ^c	27,41 ± 2,87 ^c

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Tabela 5: Números corrigidos de espermatogônias do tipo A (SGA), de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (PL/L), de espermatócitos primários em paquíteno (PAQ), de espermátides arredondadas (EAR), índice mitótico (IMI) e índice meiótico (IME) de camundongos adultos tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
SGA	1,16 ± 0,24 ^a	1,15 ± 0,11 ^a	1,15 ± 0,26 ^a	0,91 ± 0,23 ^a
PL/L	16,40 ± 1,99 ^a	18,23 ± 2,47 ^a	16,73 ± 2,00 ^{ab}	12,91 ± 3,36 ^b
PAQ	17,70 ± 2,5 ^a	17,78 ± 1,12 ^a	15,30 ± 2,30 ^a	11,60 ± 2,48 ^b
EAR	43,53 ± 1,99 ^a	43,77 ± 1,36 ^a	36,40 ± 5,42 ^b	25,83 ± 4,49 ^c
IMI	14,68 ± 3,52 ^a	15,89 ± 1,83 ^a	15,38 ± 4,88 ^a	15,04 ± 6,38 ^a
IME	2,51 ± 0,44 ^a	2,47 ± 0,11 ^a	2,40 ± 0,30 ^a	2,25 ± 0,24 ^a

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Tabela 6: Índice de célula de Sertoli (ICS), número de células de Sertoli por testículo (CS/T), número de células de Sertoli por grama de testículo (CS/gT), capacidade total de suporte (CTS), rendimento geral da espermatogênese (RGE) e produção espermática diária (PED) de camundongos adultos tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
ICS	7,95 ± 1,50 ^a	7,43 ± 0,72 ^{ab}	6,50 ± 1,01 ^b	4,96 ± 0,68 ^c
CS/T(x10 ⁶)	8,19 ± 1,24 ^a	9,02 ± 1,35 ^a	9,05 ± 1,24 ^a	7,87 ± 2,44 ^a
CS/gT (x10 ⁶)	89,57 ± 20,38 ^a	83,14 ± 12,46 ^a	101,82 ± 7,27 ^a	95,02 ± 12,19 ^a
CTS	14,39 ± 2,75 ^a	13,79 ± 1,91 ^a	12,41 ± 1,59 ^a	9,81 ± 1,01 ^b
RGE	38,69 ± 7,22 ^a	38,34 ± 4,01 ^a	33,32 ± 10,74 ^a	30,19 ± 10,82 ^a
PED (x10 ⁶)	7,11 ± 0,91 ^a	7,01 ± 1,11 ^a	6,53 ± 1,40 ^a	4,26 ± 1,19 ^b
Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.				

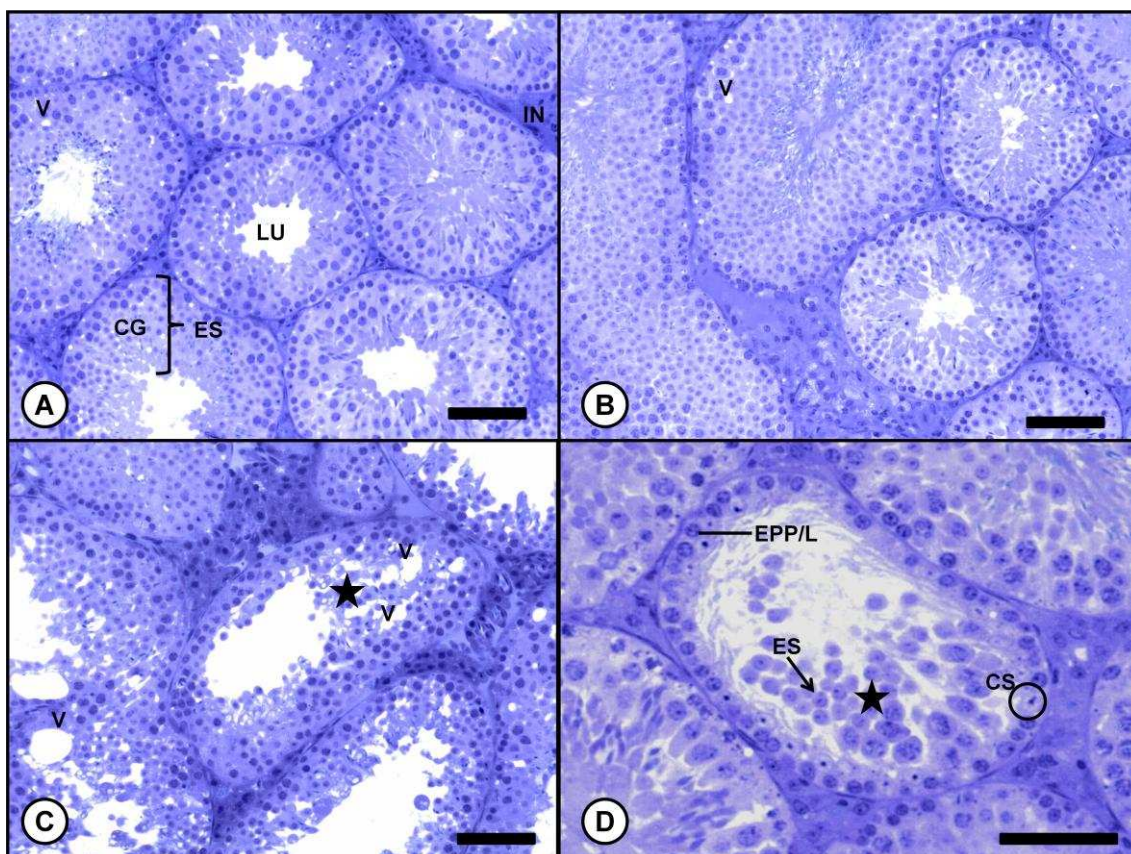


Figura 1: Fotomicrografias de testículos de camundongos do grupo que recebeu água (A), DMSO (B) e tratados com EHRPG 300mg/Kg de peso corporal (C e D). Em A e B observa-se a presença de poucos vacúolos (V) univesiculares, túbulos com integridade celular e processo espermatogênico normal. Em C, destaca-se a presença de vacúolos (V) uni e multivesiculares nas células de Sertoli e descamação celular (estrela). A Figura D mostra que células do ambiente basal, como espermatócitos primário em pré-leptóteno (EPP/L) e células de Sertoli (CS), encontram-se em seu sítio de localização, enquanto que as células do ambiente adluminal, como espermátides arredondadas (ES), descamaram-se em direção ao lúmen (estrela) tubular. Barras: A, B e C= 75µm, D= 90µm. Coloração: azul de toluidina/borato de sódio.

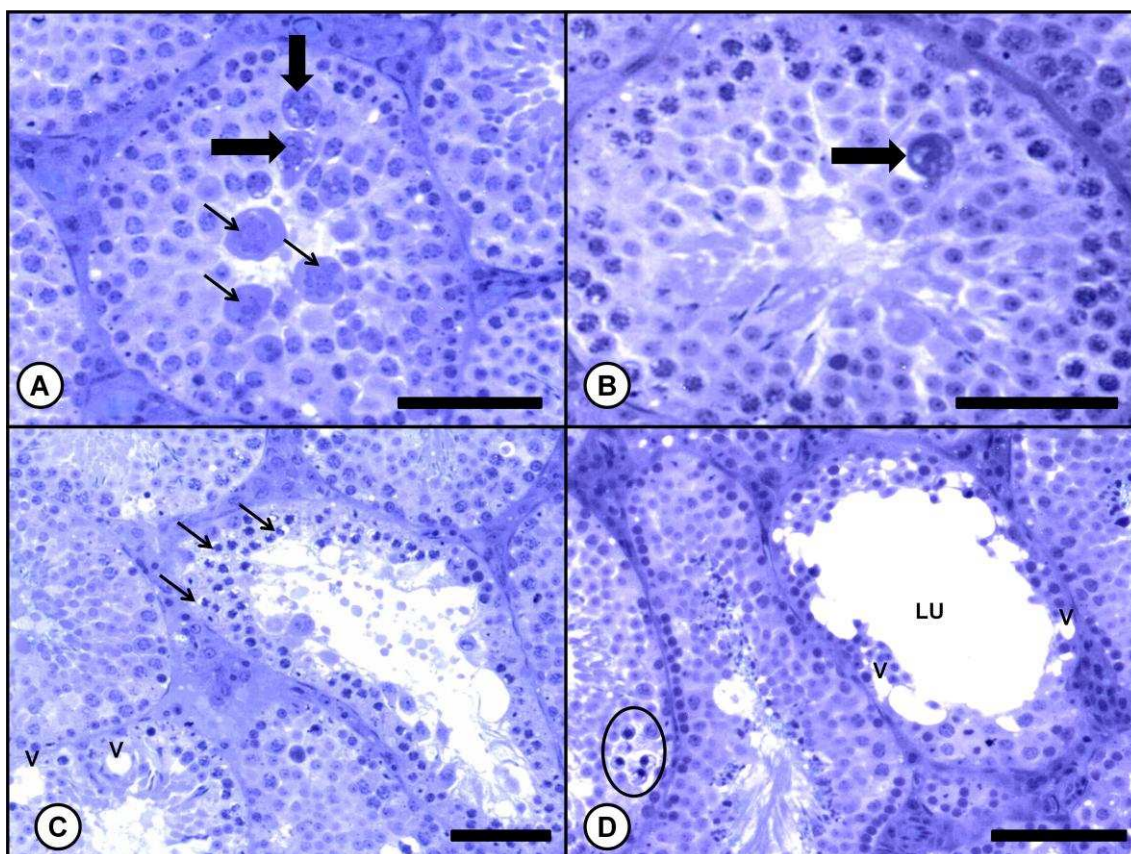


Figura 2: Fotomicrografias de testículos de camundongos tratados com EHRPG 300 (A e C) e 400mg/Kg (B e D) de peso corporal. Em A e B, há células multinucleadas gigantes, provenientes de uma divisão meiótica anormal (setas largas), e espermatídes arredondadas (setas finas). Em C observa-se a presença de vacúolos (V) e células germinativas em processo de degeneração (setas finas). Em D um grupo de quatro células apresenta-se também em degeneração (círculo) com o lúmen (LU) aumentado, o que reflete a alteração quantitativa sofrida pelas células adluminais. Barras: A= 80 μ m, B= 90 μ m, C= 65 μ m, D= 85 μ m. Coloração: azul de toluidina/borato de sódio.

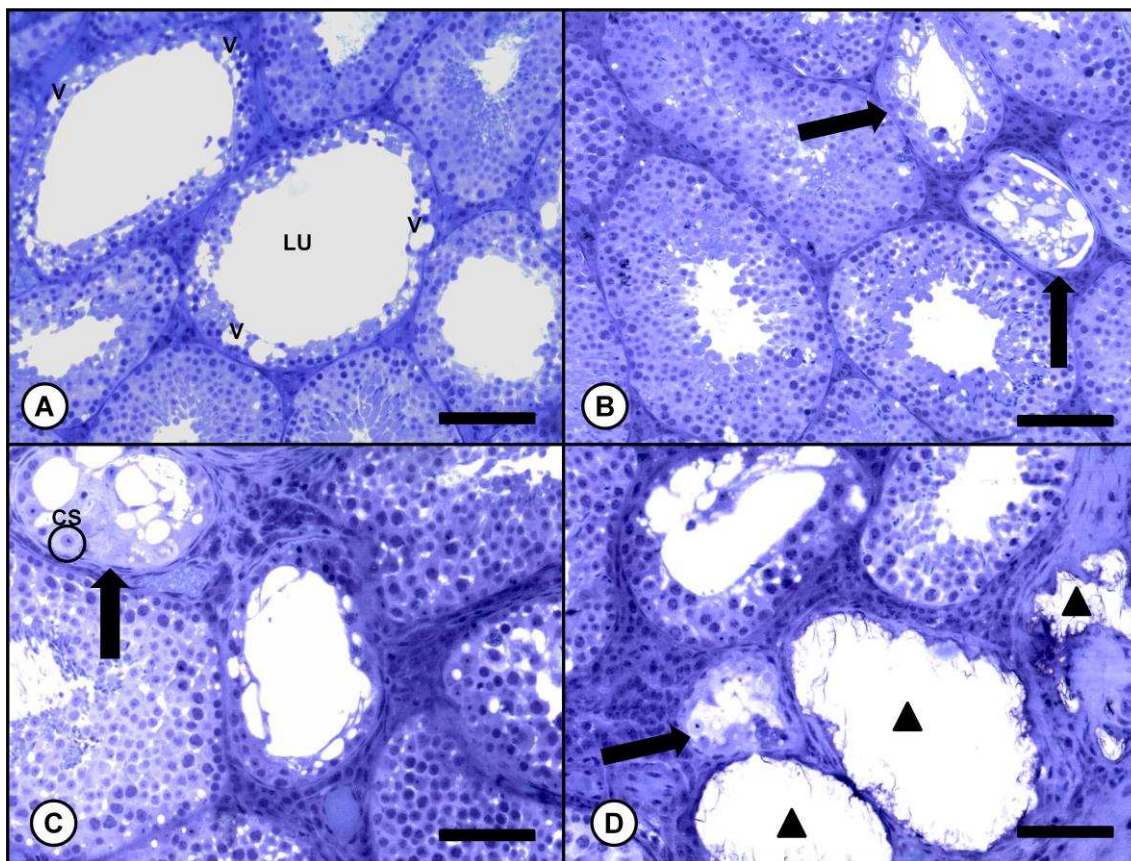
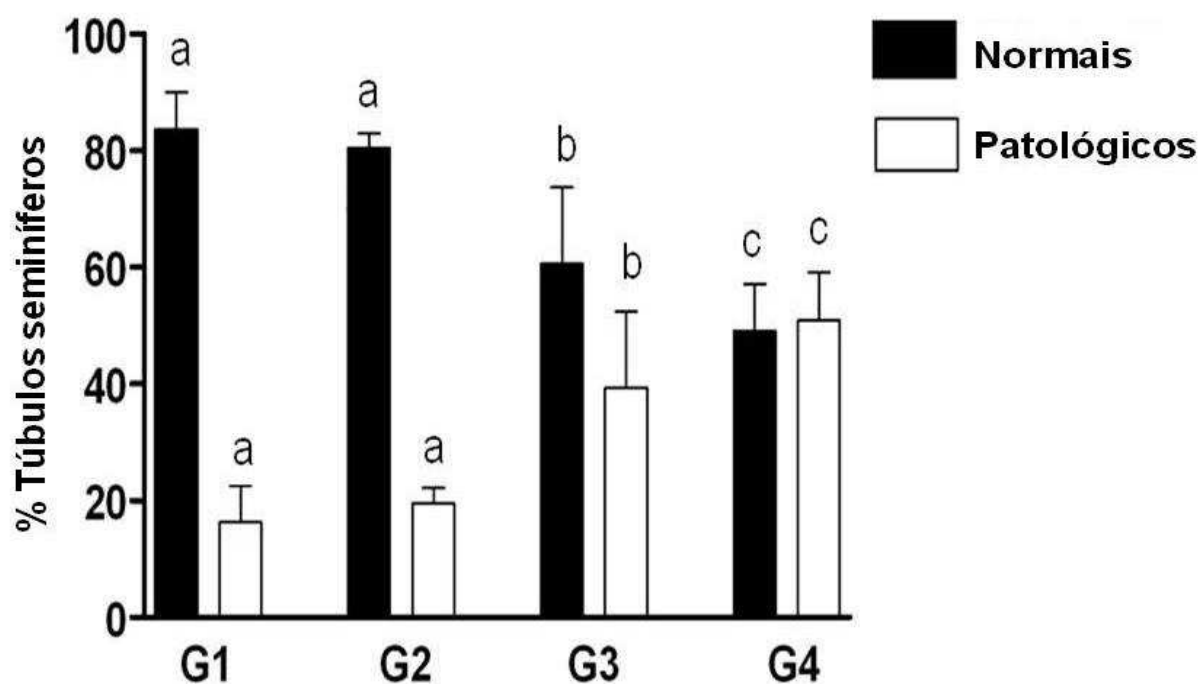


Figura 3: Fotomicrografias de testículos de camundongos tratados com EHRPG 300 (A e C) e 400mg/Kg (B e D) de peso corporal. Em A observa-se a perda de células adluminais, deixando o lúmen (LU) com aspecto aumentado, histopatologia classificada como de nível 4, presente em ambos os tratamentos. Em B, C e D as setas largas indicam túbulos atrofiados, mas contendo ainda as células de Sertoli (CS). Na figura D, três túbulos encontram-se em um grau máximo de estado degenerativo (triângulos), não existindo células de Sertoli ou germinativas, sendo classificado como nível patológico 5, que indica estado irreversível de degeneração. Barras: 75µm. Coloração: azul de toluidina/borato de sódio.

Figura 4. Proporção de túbulos seminíferos normais e patológicos de camundongos adultos, após tratamento com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.



Letras diferentes nas barras, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg

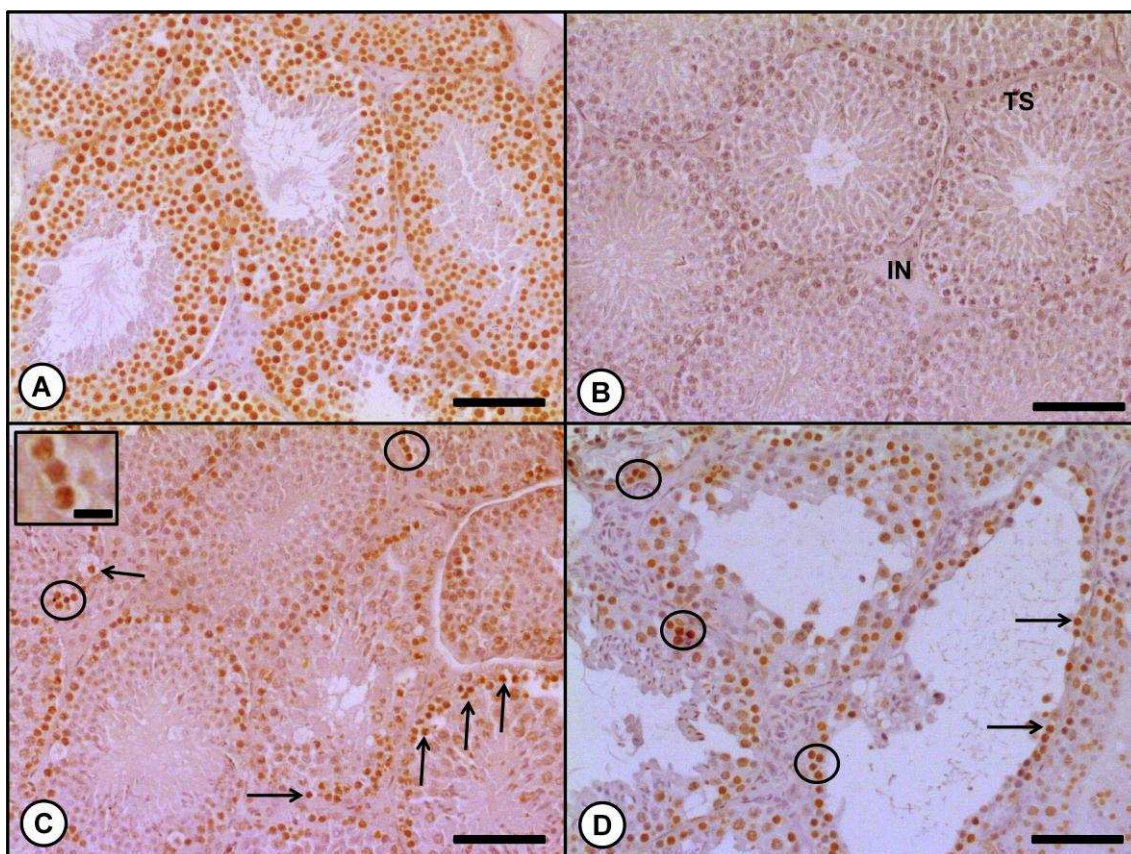
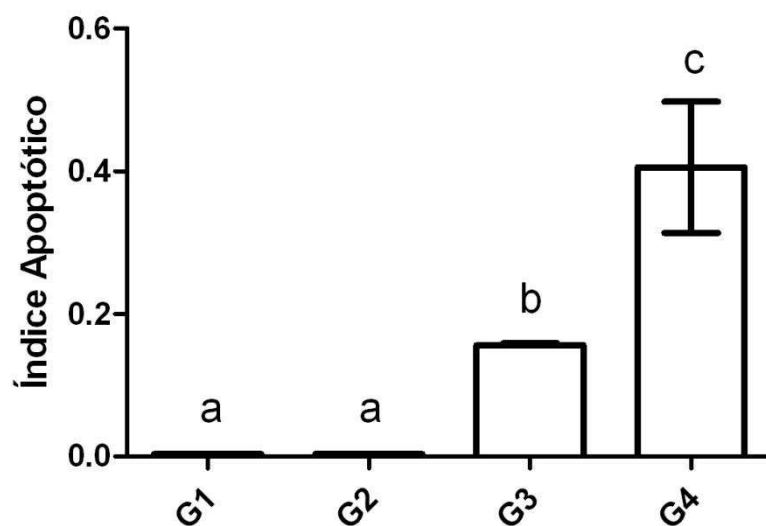


Figura 5: Fotomicrografias do parênquima testicular de camundongos, apresentando várias secções de túbulos seminíferos em controles TUNEL positivo (A) negativo (B) e tratados com EHRPG 300 (C) e 400mg/Kg (D) de peso corporal. A coloração marrom mostra núcleos apoptóticos. Em C e D células germinativas apoptóticas (setas e círculos). TS: Túbulos seminíferos; IN: intertúbulo. Barras: 70 μ m; detalhe = 15 μ m.

Figura 6. Índice apoptótico de células germinativas de camundongos adultos, após tratamento com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.



Letras diferentes nas barras, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg; G4: EHRPG 400 mg

Capítulo 3

Ação da *Pffafia glomerata* nas células de Leydig, corpos cavernosos e na concentração de testosterona sérica de camundongos adultos

RESUMO

O emprego de plantas com ação afrodisíaca na medicina popular é uma prática antiga que merece ser investigada cientificamente, a fim de se avaliar os riscos e os benefícios de sua utilização, desmistificando ou validando sua aplicabilidade. Buscou-se avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pffafia glomerata* (EHRPG) sobre a morfometria do ambiente intertubular, dos corpos cavernosos e na concentração de testosterona sérica de camundongos adultos tratados cronicamente. Foram utilizados 24 animais (n=6), divididos em 4 grupos (G1 a G4), todos eles recebendo água *ad libitum* e ração comercial reduzida em 10%. O tratamento foi feito através de gavagem com os animais recebendo apenas água (G1), dimetilsulfóxido (DMSO) (G2) e EHRPG diluído em DMSO (G3 e G4) nas dosagens de 300 e 400 mg/Kg de peso corporal, respectivamente. Observou-se aumento no peso corporal em G3 e G4. A proporção e o volume de espaço linfático aumentaram no grupo tratado com 300mg/Kg do EHRPG, que apresentou ainda diminuição na proporção de túbulos seminíferos e aumento na proporção de intertúbulo em relação aos grupos controles. Os corpos cavernosos, mais dilatados, ocuparam proporcionalmente maior espaço no pênis, reduzindo a quantidade de tecido conjuntivo nos animais tratados em relação aos animais que receberam água e DMSO. Houve aumento na concentração de testosterona sérica nos animais que receberam 400mg/Kg de peso corporal do extrato em relação a G1. Conclui-se que o extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata*, nas doses administradas, não exerceu influência sobre as células de Leydig e demais elementos do ambiente intertubular, mas apresentou ação vasodilatadora. O aumento na concentração de testosterona na maior dosagem administrada provavelmente contribuiu para que essa ação vasodilatadora seja intensificada. Mais estudos estão sendo feitos para encontrar o modo de ação dos componentes do EHRPG no intertúbulo e no mecanismo erétil.

1. INTRODUÇÃO

Em várias partes do mundo há uma multiplicidade de terapias à base de plantas com finalidade de restaurar a ereção e manter a saúde sexual em geral. Esses produtos naturais são geralmente muito atraentes para os consumidores, porque além da crença popular de que por ser natural são livres de efeitos colaterais, são supostamente menos dispendiosos do que produtos farmacêuticos (Ho e Tan, 2011). Com essa posição de destaque na medicina popular, os afrodisíacos têm despertado o interesse de pesquisadores que se preocupam em desmistificá-los ou validá-los quanto a sua aplicabilidade. Essas substâncias podem ter diferentes mecanismos de ação. Alguns podem aumentar o desejo e o prazer sexual através das propriedades alucinógenas ou estimulantes do humor. Porém, o efeito afrodisíaco também pode ocorrer por mudanças hormonais, tendo ação sobre as células de Leydig ou sobre a arquitetura e fisiologia peniana, além de agir no relaxamento do músculo liso aumentando o fluxo sanguíneo e permitindo a vasodilatação dos corpos cavernosos, com consequente ereção (Sandroni, 2001; Chaturapanich et al., 2008; Zamblé, 2008; Traish, 2009; Castela et al., 2011; Malviya et al., 2011). Por esse motivo, investigações morfológicas e morfométricas do compartimento intertubular dos testículos e dos corpos cavernosos do pênis, bem como a medida da concentração de testosterona em animais tratados com afrodisíacos utilizados popularmente podem trazer respostas sobre sua real aplicabilidade e seus possíveis mecanismos de ação.

O compartimento intertubular dos mamíferos é formado pelas células de Leydig, que representam a porção endócrina, por células do conjuntivo (macrófagos e fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos (Sharpe, 1994). As células de Leydig adultas contêm grande quantidade de retículo endoplasmático liso, pequenas gotas lipídicas, alta atividade de enzimas esteroidogênicas e secretam a testosterona como andrógeno predominante (Ge et al., 2006). A testosterona mantém a espermatogênese, promove a diferenciação do trato genital masculino, mantém os caracteres sexuais secundários e a função de glândulas acessórias, a arquitetura do tecido erétil e a fisiologia peniana (O'Donnel et al., 2001; Colleta et al., 2005; Traish, 2009; Castela et al., 2011). Ratos e camundongos apresentam um padrão de intertúbulo no qual as células de Leydig estão associadas aos vasos sanguíneos e envolvidas pelo fluido linfático (Fawcett et al., 1973).

O pênis é constituído pela uretra e três corpos cilíndricos de tecido erétil, sendo que dois deles, os corpos cavernosos do pênis, estão localizados na parte dorsal do órgão, e o terceiro, corpo cavernoso da uretra, localizado ventralmente. Os corpos cavernosos são compostos de tecido erétil contendo grande quantidade de espaços venosos separados por trabéculas de fibras de tecido conjuntivo e células musculares lisas, sendo envolvidos pela albugínea peniana (Junqueira e Carneiro, 2004). A função erétil é um mecanismo fisiológico neurovascular complexo, que depende da interação de fatores neurais, vasculares, hormonais, bem como de integridade estrutural dos componentes celulares do pênis (Bivalacqua et al., 2003; Traish, 2009; Castela et al., 2011). Os corpos cavernosos constituem a principal massa do corpo do pênis, formando o seu dorso e partes laterais. O tecido erétil dos corpos cavernosos é irrigado, em sua maior parte, pela artéria cavernosa que, ao longo de seu curso, fornece várias artérias helicinais que vão suprir o tecido trabecular (Gray, 1988). O tecido conjuntivo nele presente deve permitir o alongamento e aumento da rigidez durante a ereção e proporcionar resistência adequada para retornar rapidamente para o estado relaxado flácido após detumescência. Por outro lado, as fibras musculares lisas devem relaxar para alcançar e manter a ereção, aumentando a pressão intracavernosa na fase erétil, a qual não pode ser alcançada apenas por mecanismos vasculares. Assim, para se alcançar a função erétil normal do pênis, uma percentagem adequada de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo são necessários (Costa et al., 2006).

A *Pfaffia glomerata* é uma espécie usada popularmente com fins afrodisíacos. Suas propriedades medicinais foram comprovadas como anti-inflamatória, analgésica (Neto et al., 2005; Queiroga et al., 2008), cicatricial (Guerreiro et al., 2009; Silva et al., 2010) e protetora, no caso da mucosa gástrica (Otofugi, 2005). Também age de forma benéfica na aprendizagem e memória de ratos idosos em modelos crônicos (Marques, 1998), na atividade depressora do sistema nervoso central e como agente amnésico (De-Paris et al., 2000). Esta planta encontra-se distribuída em toda América do Sul, tropical e subtropical, sendo que no Brasil ocorre principalmente no Paraná e Mato Grosso do Sul (Teske e Trentini, 2001), além de São Paulo, Paraná, Mato Grosso e Goiás (Neto et al., 2005; Silva et al., 2010).

Apesar da ampla utilização popular e até mesmo da comercialização de produtos contendo compostos dessa espécie, não há registro de experimentação científica sobre o potencial afrodisíaco atribuído a esta planta, em nível androgênico e vasodilatador. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do EHRPG sobre a morfometria e

estereologia das células de Leydig e demais componentes do tecido intertubular, dos corpos cavernosos e sobre a concentração de testosterona sérica de camundongos adultos tratados cronicamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Planta e preparação do extrato

A matriz de *Pfaffia glomerata* utilizada neste estudo foi obtida da coleção de Germoplasma de Plantas Medicinais da Embrapa/Cenargen (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia), Brasília, Distrito Federal e cultivada em estufas na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

A preparação do extrato foi realizada no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. O extrato de *Pfaffia glomerata* foi obtido a partir de 1,2 Kg da raiz moída, imerso por 24h na presença de álcool etílico 95% (solvente) pelo método de percolação. O conteúdo proveniente da extração foi colocado em um evaporador rotativo e em seguida liofilizado. O rendimento da extração foi de 10,35%.

2.2 - Grupos experimentais e tratamento

Foram utilizados 24 camundongos BALB/c em idade reprodutiva (50 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais, divididos em 4 grupos de 6 indivíduos, foram pesados e colocados em gaiolas coletivas. Todos os grupos foram submetidos a uma restrição calórica leve (10%). O tratamento foi feito por gavagem e os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 24°C e luminosidade de 12 horas. O grupo 1 (G1) recebeu apenas água e o grupo 2 (G2) recebeu DMSO. Os grupos 3 (G3) e 4 (G4) receberam 300 e 400mg/kg de peso corporal do EHRPG, respectivamente, diluídos em 0,2 mL de DMSO. A fase de tratamento teve duração de 42 dias consecutivos, sendo os animais avaliados nas suas condições biométricas e eutanasiados ao final do período de tratamento.

2.3 - Coleta de amostras e microscopia de luz

Todo o procedimento experimental seguiu as determinações da comissão de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sendo aprovado sob o protocolo Nº 67/2010.

Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados através de inalação de CO₂. O sangue foi coletado através de punção cardíaca, centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm, sendo o soro congelado para realização da análise de testosterona. Em seguida, foram removidos os testículos e glândulas acessórias e fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965).

Fragmentos de um dos testículos e do pênis, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3 µm, mantendo-se um intervalo de 12 cortes, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. Imagens foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

2.4. Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo

Para se obter as proporções volumétricas (%) dos componentes intertubulares foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Os elementos quantificados foram: tecido conjuntivo, macrófagos, vasos sanguíneos, espaço linfático e células de Leydig.

O volume (ml) dos elementos intertubulares foi calculado a partir da porcentagem do elemento no testículo/100, multiplicada pelo peso do parênquima de 1 testículo.

2.5. Diâmetro, volumes nuclear e citoplasmático, número de células de Leydig por testículo, por grama de testículo, relação nucleoplasmática da célula de Leydig e Índice Leydigossomático

Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal, escolhendo os que apresentavam contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

Para se calcular os volumes (μm^3) nuclear (VN), citoplasmático (VC) e de cada célula de Leydig (VL) por testículo, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear; $VC = \% \text{ de citoplasma} \times VN / \% \text{ de núcleo}$;
 $VC = VN + VC$

Os números de células de Leydig por testículo (LTT) e por grama de testículo (LGTT) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

$LTT = \text{volume que as células de Leydig ocupam por testículo } (\mu m^3) / \text{volume de uma célula de Leydig } (\mu m^3)$

$LGTT = \text{volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo } (\mu m^3) / \text{volume de uma célula de Leydig } (\mu m^3)$

Onde:

Volume que a células de Leydig ocupa por testículo = proporção da célula de Leydig no testículo X peso do parênquima de um testículo / 100

Volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo = volume que a célula de Leydig ocupa por testículo / peso bruto de um testículo

Para calcular a relação nucleoplasmática (%) das células de Leydig dividiu-se o percentual ocupado pelo núcleo pelo percentual ocupado por citoplasma. Este percentual foi obtido a partir da contagem de 1000 pontos sobre núcleo e citoplasma.

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

2.6. Morfometria dos corpos cavernosos

As proporções volumétricas de corpos cavernosos e de tecido conjuntivo foram estimadas a partir da contagem de 2.552 pontos projetados sobre imagens capturadas, utilizando objetiva de 10X, totalizando 10 campos aleatórios nas preparações histológicas do pênis de cada animal.

2.7. Testosterona sérica

A concentração plasmática de testosterona foi obtida pelo método de quimiluminescência, utilizando-se kit Access[®] Testosterone (Beckman, USA). As leituras foram realizadas em aparelho Access II (Beckman, USA) e os resultados foram expressos em ng/dL.

3. Análises estatísticas

Os parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p < 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Análise biométrica e morfométricas testiculares

O peso corporal aumentou nos animais que receberam as duas dosagens do extrato em relação ao G1 (Tabela 1).

A proporção volumétrica e o volume do espaço linfático aumentaram no grupo tratado com 300mg/Kg do extrato de *Pfaffia glomerata*, sendo o primeiro parâmetro significativo em relação a G1 e G4, e o segundo parâmetro em relação apenas a G4 (Tabelas 2 e 3 e Figura 1). O G3 apresentou ainda diminuição da proporção de túbulos seminíferos e aumento na proporção de intertúbulo em relação aos grupos controles (Tabelas 2 e 3).

4.2. Morfometria do tecido erétil

Histologicamente é possível observar a dilatação expressiva nos corpos cavernosos dos animais que receberam as duas doses do extrato (Figura 2). Esse fato foi confirmado com a contagem de pontos sobre corpos cavernosos e tecido conjuntivo, onde os corpos cavernosos ocuparam proporcionalmente maior espaço, com diminuição da quantidade de tecido conjuntivo nos animais tratados, em relação aos que receberam água e DMSO (Figura 3).

4.3. Concentração de testosterona sérica

Na Figura 4 observam-se os resultados da testosterona sérica, onde houve um aumento desse hormônio nos animais tratados com EHRPG na dosagem de 400 mg/kg de peso corporal em relação aos animais que receberam água.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho se baseou em princípios da morfometria e estereologia, por serem métodos quantitativos frequentemente utilizados nos estudos envolvendo extratos vegetais e parâmetros reprodutivos. Estas análises auxiliam nas comparações entre os

grupos experimentais e proporcionam maior confiabilidade para o diagnóstico final (Chieregatto, 2005; Melo et al., 2010; Gomes et al., 2011; Monteiro et al., 2012).

A parte funcional dos testículos é representada pelo parênquima testicular, constituído pelo compartimento tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico (Russell et al., 1990). No presente trabalho a diminuição na proporção volumétrica de túbulos seminíferos representa uma diminuição na porção gametogênica, nos caso dos animais que receberam a menor concentração do EHRPG. De maneira compensatória, essa redução tubular foi acompanhada a um aumento na proporção de tecido intertubular, não interferindo na massa do parênquima que é representado por esses dois compartimentos. Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com EHRPG na dose de 400mg, diminuiu a produção espermática, produzindo efeitos negativos para o ambiente tubular dos testículos de camundongos adultos. A mesma concentração do extrato não interferiu nas células de Leydig e demais elementos do ambiente intertubular, atuando de forma diferenciada nos tipos celulares constituintes do parênquima testicular.

Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies de mamíferos 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 (Russell, 1996). Os demais elementos apresentam variações menos evidentes quanto à proporção volumétrica (Paula et al., 2007). Em termos da proporção e da volumetria, o único elemento que sofreu variação foi o espaço linfático, aumentando nos animais que receberam 300mg/Kg do EHRPG. O espaço linfático tem papel fundamental na recirculação de fluido, que entra nos tecidos através dos capilares sanguíneos, mantendo assim a homeostase normal dos tecidos com extensivo fluido e efluxo celular (Witte et al., 2006; Hirai et al., 2010; Hirai et al., 2011). Segundo Fawcett et al. (1973), o aumento do espaço linfático pode estar relacionado com sua capacidade de excluir materiais do testículo para manter o equilíbrio das concentrações de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos.

O ILS é um parâmetro que visa quantificar o investimento em células de Leydig, com relação ao peso corporal. O valor estimado de ILS para camundongos é de 0,03% (Russell, 1996). Animais tratados com ambas as concentrações do extrato mantiveram média inferior à citada acima, apesar de não terem variado significativamente com o controle. Os valores do ILS foram bem próximos de camundongos que receberam o

extrato etanólico de *Ouratea semiserrata* (Matta, 2008), os quais também não apresentaram variações nesse parâmetro.

A ausência de alterações nos parâmetros relativos às células de Leydig, após a administração do EHRPG, é um achado positivo, já que elas são responsáveis pela produção de testosterona.

Segundo Traish (2009) e Castela et al. (2011), a testosterona desempenha importante papel na manutenção do tecido erétil e na fisiologia peniana, modulando a função neural e a integridade estrutural do músculo liso, do endotélio e da matriz do tecido conjuntivo, bem como nas vias metabólicas de sinalização. A testosterona pode melhorar a rigidez peniana, aumentando o fluxo sanguíneo para o pênis, sendo necessária para melhorar a resposta venoclusiva (Bhasin e Benson, 2006). A capacidade de diferentes plantas medicinais em melhorar a função sexual, como demonstrado em *Pfaffia paniculata* (Oshima e Gu, 2003), *Tribulus terrestris* (Gauthaman e Ganesan, 2008) *Panax ginseng* e *Ferula hermonis* (Zanoli et al., 2009), foi atribuído ao aumento da concentração de testosterona sérica, sendo que em algumas espécies a ação desse hormônio atuou especificamente nos reflexos penianos, como em animais tratados com *Arctium lappa* (JianFeng et al., 2012) e *Tribulus terrestris* (Singh et al., 2012). Segundo James e Nyby (2002), elevações na concentração de testosterona circulante, acima do padrão, pode, sob certas condições, alterar rapidamente o comportamento sexual de ratos machos. Hart (1983) sugere que os reflexos do pênis são potencializados pelo aumento de testosterona que ocorre em resposta a estímulos sexuais relevantes. No presente estudo, a maior dose de EHRPG foi capaz de aumentar a concentração de testosterona sérica.

Baseado em análises morfométricas, observou-se que o EHRPG, em ambas as concentrações, foi capaz de aumentar proporcionalmente os corpos cavernosos, indicando aumento do fluxo sanguíneo. A modificação estrutural possivelmente promoveu melhora no mecanismo da ereção peniana, tendo o EHRPG um efeito vasodilatador. Entende-se que o aumento na concentração de testosterona na maior dose contribuiu para que esse efeito fosse intensificado e, portanto, mais evidente.

Além da importância da testosterona sobre a saúde peniana, a função normal do pênis é alcançada quando existe uma porcentagem adequada dos elementos que constituem o tecido dos corpos cavernosos, já que apenas por mecanismos vasculares essa normalidade não poderia ser alcançada. Um estudo realizado com ratos submetidos ao estresse crônico demonstrou que este foi capaz de causar mudanças estruturais no

corpo cavernoso, aumentando a proporção de tecido conjuntivo sugerindo uma possível fibrose no pênis, podendo desempenhar um papel na disfunção erétil (de Souza et al., 2011). No presente estudo o EHRPG, nas duas dosagens, promoveu aumento da proporção de corpos cavernosos, e redução proporcional do tecido conjuntivo, fato este que contribuiu para ereção peniana.

Estudos com *Panax ginseng* realizados em coelhos machos demonstraram que a espécie é capaz de causar relaxamento da musculatura endotelial, tendo ação vasodilatadora, sendo seus efeitos atribuídos aos ginsenosídeos, também presentes na espécie em estudo (Chen e Lee, 1995; Kim et al., 1998; Ho e Tan, 2011). Alguns estudos realizados sobre os efeitos de extratos vegetais ou de seus constituintes isolados sobre a ereção peniana comprovaram sua ação sobre as células musculares endoteliais, tendo um efeito relaxante, melhorando o mecanismo da ereção (Chen et al., 2000; Kim et al., 2011; Abdelwahab et al., 2012; Li et al., 2012). Segundo Dean e Lue (2005) o músculo liso é capaz de controlar o evento vascular levando a ereção, sendo fundamental para a resposta erétil. Elas devem relaxar para manter a ereção, aumentando a pressão intracavernosa durante a ereção (Costa et al., 2006). A ação do EHRPG é provavelmente sobre as células musculares endoteliais, já que o relaxamento das mesmas é que produz o aumento do fluxo sanguíneo para os espaços lacunares.

Várias espécies de plantas medicinais de uso popular tiveram suas propriedades afrodisíacas comprovadas através de estudos em animais experimentais, tais como *Pffaffia paniculata* (Arletti et al., 1999), *Fadogia agrestis* (Yakubu et al., 2005; Malviya et al., 2011), *Lepidium meyenii* (Cicero et al., 2001; Cicero et al., 2002; Zheng et al., 2000) e óleo essencial de *Satureja khuzestanica* (Haeri et al., 2006). Porém nem todas tiveram seus mecanismos de ação esclarecidos. Assim como as espécies citadas acima, supõe-se que *Pffaffia glomerata* apresente potencial afrodisíaco com ação vasodilatadora e aumento dos níveis séricos de testosterona. Seus mecanismos de ação poderão ser futuramente melhor esclarecidos a partir do isolamento, quantificação e identificação dos constituintes ativos presentes na espécie e com estudos clínicos.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pffaffia glomerata*, nas doses administradas, não exerce influência sobre as células de Leydig e demais elementos do compartimento intertubular. Os corpos cavernosos dos animais tratados apresentaram aumento na sua proporção, mostrando-se mais dilatados. Houve aumento na

concentração de testosterona sérica nos animais que receberam maior dose do extrato de *P. glomerata*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHAB, S. I.; MOHAMED, A. H.; MOHAMED, O. Y.; OALL, M.; TAHA, M. M. E.; MOHAN, S.; NOORDIN, M. I.; MUSTAFA, M. R.; ALKHARFY, K. M. Erectogenic effects of *Clerodendron capitatum*: Involvement of phosphodiesterase type-5 Inhibition. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012: 1-6, 2012.

ARLETTI, R.; BENELLI, A.; CAVAZZUTI, E.; SCARPETTA, G.; BERTOLINI, A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. Psychopharmacology, 143: 15-19, 1999.

BHASIN, S.; BENSON, G. S. Male Sexual Function. In: CHALES, J. R. G.; PFAFF, D. W.; PLANT, T. M.; KRETZER, D. M.; RICHARDS, J. S.; WASSARMAN, P. M (eds). Physiology of reproduction. San Diego: Elsevier, p: 1173-1194, 2006.

BIVALACQUA, T. J.; USTA, M. F.; CHAMPION, H. C.; ADAMS, D.; MCNAMARA, D. B.; ABDEL-MAGEED, A. B.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. G. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase partially restores nitric oxide synthesis and erectile function in streptozotocin diabetic rats. Journal of Urology, 169: 1911-1917, 2003.

CASTELA, A.; VENDEIRA, P.; COSTA, C. Testosterone, endothelial health, and erectile function. International Scholarly Research Network Endocrinology, 2011: 1-7, 2011.

CHATURAPANICH, G.; CHAIYAKUL, S.; VERA-WATNAPAKUL, V.; PHOLPRAMUOL, C. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatic blood flow in male rats. Reproduction, 136: 515-522, 2008.

CHEN, J.; CHIOU, W.; CHEN, C.; CHEN, C. Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue *in vitro*. American Urological Association, 163: 1975-1980, 2000.

CHEN, X.; LEE, T.J.F. Ginsenosides-induced nitric oxide-mediated relaxation of the rabbit corpus cavernosum. *British Journal of Pharmacology*, 115: 15-8, 1995.

CHIEREGATTO, L. C. Efeito do Tratamento Crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 67p, 2005 (Dissertação, mestrado).

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*, 75: 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*, 34: 177-179, 2002.

COLLETA, H. H. M. D.; CARVALHO, H. F. Células de Leydig. In: CARVALHO, H.F.; COLARES-BUZATO, C.B.; (eds). *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Manole, p: 325-334, 2005.

COSTA, W.S.; CARRERETE, F.B.; HORTA, W.G.; SAMPAIO, F. J. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *British Journal of Urology International*, 97: 566-569, 2006.

DEAN, R. C.; LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urologic Clinics of North America*, 32: 1-24, 2005.

DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S.M.K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 261-269, 2000.

DE SOUZA, D. B.; SILVA, D.; CORTEZ, C. M.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *Journal of Andrology*, 22: 1-17, 2011.

FAWCETT, D.W.; NEAVES, W.B.; FLORES, M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9: 500-532, 1973.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction – an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine*, 15: 44–54, 2008.

GE, R. S.; DONG, Q.; SOTTAS, C. M.; PAPADOPOULOS, V.; ZIRKIN, B. R.; HARDY, M. P. In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. *PNAS*, 103: 2719–2724, 2006.

GRAY, D. J. Região Perineal e Órgãos Genitais Externos. In: GARDNER, E.; GRAY, D.J.; RAHILLY, R.; (eds). *Anatomia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p: 485-495, 1988.

GOMES, M. L. M.; MONTEIRO, J. C.; FREITAS, K. M.; BERVELHERI, M. M. S.; DOLDER, H. Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenetic advantages. *Biological Research*, 44: 235-241, 2011.

GUERREIRO, C. P. V.; MARQUES, M. O. M.; FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N.; MING, L. C. Produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função da adubação orgânica em 6 épocas de crescimento. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11: 392-398, 2009.

HAERI, S.; MINAIE, B.; AMIN, G.; NIKFAR, S.; KHORASANI, R.; ESMAILY, H.; SALEHNIA, A.; ABDOLLAHI, M. Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on male rat fertility. *Fitoterapia*, 77: 495-499, 2006.

HART, B. L. Role of testosterone secretion and penile reflexes in sexual behavior and sperm competition in male rats: A theoretical contribution. *Physiology & Behavior*, 31: 823-827, 1983.

HIRAI, S., NAITO, M.; TERAYAMA, H.; QU, N.; KUERBAN, M.; MUSHI, M.; IKEDA, A.; MIURA, M.; ITOH, M. The origin of lymphatic capillaries in murine testes. *Journal of Andrology*, 3: 1-28, 2011.

- HIRAI, S.; NAITO, M.; TERAYAMA, H.; QU, N.; MIURA, M.; ITOH, M. Distribution of blood and lymphatic capillaries in the murine epididymis. *Medical Molecular Morphology*, 43: 37-42, 2010.
- HO, C.C.; TAN, H. M. Rise of herbal and traditional medicine in erectile dysfunction management. *Current Urology Reports*, 12: 470-478, 2011.
- JAMES, P. J.; NYBY, J. G. Testosterone rapidly affects the expression of copulatory behavior in house mice (*Mus musculus*). *Physiology & Behavior*, 75: 287-294, 2002.
- JIANFENG, C.; PENGYING, Z.; CHENGWEI, X.; TAOTAO, H.; YUNGUI, B.; KAOSHAN, C. Effect of aqueous extract of *Arctium lappa* L. (burdock) roots on the sexual behavior of male rats. *Complementary and Alternative Medicine*, 12: 1-8, 2012.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica. Texto e Atlas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 10 ed. p: 415-431, 2004.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137-138, 1965.
- KIM, H. J.; WOO, D. S.; LEE, G.; KIM, J. J. The relaxation effects of ginseng saponin in rabbit corporal smooth muscle: is it a nitric oxide donor? *British Journal of Urology*, 82: 744-748, 1998.
- KIM, H. K.; BAK, Y. O. K.; CHOI, B. R.; ZHAO, C.; LEE, H. J.; KIM, C. Y.; LEE, S. W.; JEON, J. H.; PARK, J. K. The role of the lignan constituents in the effect of *Schisandra chinensis* fruit extract on penile erection. *Phytotherapy Research*, 25: 1776-1782, 2011.
- LI, X.; OH, H. C.; SON, S. B.; LEE, Y. J.; KANG, D. G.; LEE, H. S. Effect of an ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* on relaxation in corpus cavernosum smooth muscle. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1-10, 2012.
- 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*, 68: 3-8, 2011.

MARQUES, L. C. Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen- Amaranthaceae. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 145p, 1998 (Tese, doutorado).

MATTA, A. P. L. F. Efeitos do extrato aquoso da raiz de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl. (Ochnaceae) sobre os testículos de camundongos Suíços adultos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 57p, 2008 (Dissertação, mestrado).

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

MONTEIRO, J. C.; MATTA, S. L. P.; PREDES, F. S.; PAULA, T. A. R. Testicular morphology of adult Wistar rats treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. leaf infusion. Brazilian Archives of Biology and Technology, 55: 101-105, 2012.

NETO, A. G.; COSTA, J. M.; BELATIA, C. C.; VINHÓLIS, A. H.; POSSEBOM, L.S.; DA SILVA, F. A. A.; CUNHA, W. R.; CARVALHO, J. C.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Journal of Ethnopharmacology, 96: 87-91, 2005.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. Endocrine Reviews, 22: 289-318, 2001.

OSHIMA, M.; GU, Y. *Pfaffia paniculata* - induced changes in plasma estradiol-17 β , progesterone and testosterone levels in mice. Journal of Reproduction and Development, 49: 177-180, 2003.

OTOFUGI, G. M. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 177p, 2005 (Dissertação, mestrado).

PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; SILVA, V.A.; COSTA, D. S.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Intertubular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50: 289-297, 2007.

QUEIROGA, C. L.; SALANDIN, M.; FILHO, A. A. S.; BASTOS, J. K.; FILHO, E. A. S.; MONTANARI, I.; CATHARINO, R.; EBERLIN, M. N. Atividade anti-inflamatória de saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, p:1241-1242, 2008.

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

RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (eds). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, p: 218-222, 1996.

SANDRONI, P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. Clinical Autonomic Research, 11: 303-307, 2001.

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

SINGH, S.; NAIR, V.; GUPTA, Y. K. Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, 3: 43-47, 2012.

SILVA, M. I.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, M. M.; VARASCHIM, M.; CZECZKO, L. E. A utilização da *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, 4: 228-233, 2010.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. Herbarium: Compêndio de Fitoterapia. 4 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório, p: 317, 2001.

TRAISH, A. M. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: A review. Journal of Andrology, 30: 363-369, 2009.

WITTE, M. H., JONES, K.; WILTING, J.; DICTOR, M.; SELG, M.; MCHALE, N.; GERSHENWALD, J. E., JACKSON, D. G. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25: 159-184, 2006.

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*, 7: 399-404, 2005.

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 Ethnopharmacol*, 116: 112 -119, 2008.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M.; MONTANARI, C.; BARALDI, M. Influence of *Eurycoma longifolia* on the copulatory activity of sexually sluggish and impotent male rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 126: 308–313, 2009.

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*, 55: 598-602, 2000.

Tabela 1: Peso corporal (PC), peso testicular (PT), peso do parênquima testicular (PPT), peso da vesícula seminal (VS) e peso do epidídimo (EP) de camundongos adultos após tratamento com o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
PC	22,00 ± 1,65 ^a	22,78 ± 1,51 ^{ab}	25,11 ± 3,08 ^b	25,34 ± 2,33 ^b
PT	0,19 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,04 ^a
PPT	0,17 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,03 ^a
VS	0,15 ± 0,00 ^a	0,18 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,04 ^a	0,16 ± 0,02 ^a
EP	0,06 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	0,06 ± 0,00 ^a

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Tabela 2: Proporção volumétrica de túbulos seminíferos (TS), intertúbulo (IN), tecido conjuntivo (TC), espaço linfático (EL), vasos sanguíneos (VS), macrófagos (MC), citoplasma (CIL) e núcleo (NL) da célula de Leydig (CL) no testículo de camundongos adultos após tratamento com o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
TS (%)	95,05 ± 1,06 ^a	94,93 ± 0,81 ^a	92,57 ± 2,60 ^b	94,15 ± 0,80 ^{ab}
IN (%)	4,95 ± 1,06 ^a	5,07 ± 0,81 ^a	6,58 ± 1,15 ^b	5,84 ± 1,79 ^{ab}
TC (%)	0,27±0,06 ^a	0,66±0,38 ^b	0,38±0,13 ^{ab}	0,54±0,18 ^{ab}
EL (%)	0,99±0,39 ^a	1,47±0,96 ^{ab}	2,17±0,86 ^b	0,69±0,65 ^a
VS (%)	0,63±0,25 ^a	0,95±0,26 ^a	1,02±0,55 ^a	1,03±0,30 ^a
MC (%)	0,07±0,04 ^a	0,18±0,08 ^b	0,01±0,02 ^a	0,10±0,03 ^a
CIL (%)	2,18±0,50 ^a	2,73±1,70 ^a	2,28±0,36 ^a	2,69±0,55 ^a
NL (%)	0,62±0,17 ^a	0,87±0,63 ^a	0,62±0,17 ^a	0,78±0,16 ^a
CL (%)	2,80±0,65 ^a	3,60±2,30 ^a	2,91±0,52 ^a	3,48±0,68 ^a

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Tabela 3: Volume (10^3) de tecido conjuntivo (TC), espaço linfático (EL), vaso sanguíneo (VS), macrófago (MC), citoplasma (CIL) e núcleo (NL) da célula de Leydig (CL) por testículo de camundongos adultos após tratamento com o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (controle)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
TC (mL)	0,23±0,06 ^a	0,44±0,29 ^a	0,31±0,11 ^a	0,39±0,13 ^a
EL (mL)	0,84±0,33 ^a	1,17±0,82 ^a	1,74±0,67 ^b	0,52±0,55 ^a
VS (mL)	0,54±0,27 ^a	0,65±0,24 ^a	0,83±0,47 ^a	0,72±0,17 ^a
MC (mL)	0,06±0,04 ^a	0,13±0,07 ^b	0,08±0,02 ^a	0,07±0,03 ^a
CIL (mL)	1,84±0,52 ^a	1,70±0,58 ^a	1,83±0,30 ^a	1,96±0,58 ^a
NL (mL)	0,53±0,19 ^a	0,54±0,32 ^a	0,50±0,12 ^a	0,57±0,17 ^a
CL (mL)	2,37±0,70 ^a	2,24±0,89 ^a	2,33±0,38 ^a	2,52±0,74 ^a
CL (/g Testículo) (mL)	25,95±6,65 ^a	32,40±20,61 ^a	26,16±4,72 ^a	31,28±6,16 ^a

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Tabela 4: Diâmetro nuclear (DN), volume nuclear (VN), volume citoplasmático (VCI) e volume (VC) da célula de Leydig, razão nucleoplasmática (RNP), índice Leydigossomático (ILS), número de células de Leydig por testículo (Nº/ testículo) e por grama de testículo (Nº /g testículo) de camundongos adultos após tratamento com o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Parâmetros	G1 (H ₂ O)	G2 (DMSO)	G3 (300mg)	G4 (400mg)
DN (µm)	6,97±0,43 ^a	7,37±0,68 ^a	7,37±0,34 ^a	7,16±0,35 ^a
VN (µm)	179,14±32,38 ^a	213,95±53,64 ^a	210,72±28,95 ^a	193,51±27,48 ^a
VCI (µm)	624,39±93,70 ^a	713,67±147,38 ^a	787,85±90,30 ^a	673,18±131,08 ^a
VC (µm)	803,53±119,05 ^a	927,62±179,34 ^a	998,57±104,92 ^a	866,69±154,12 ^a
RNP (%)	28,74±3,74 ^a	30,41±7,98 ^a	26,90±3,86 ^a	29,18±3,39 ^a
ILS (%)	0,011±0,003 ^a	0,009±0,004 ^a	0,009±0,002 ^a	0,01±0,002 ^a
Nº/ testículo (*10⁶)	3,03±1,04 ^a	2,45±1,05 ^a	2,34±0,34 ^a	2,96±0,91 ^a
Nº /g testículo (*10⁶)	33,28±10,80 ^a	35,21±22,90 ^a	26,24±4,20 ^a	37,68±12,39 ^a

Letras diferentes nas linhas, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p<0,05). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

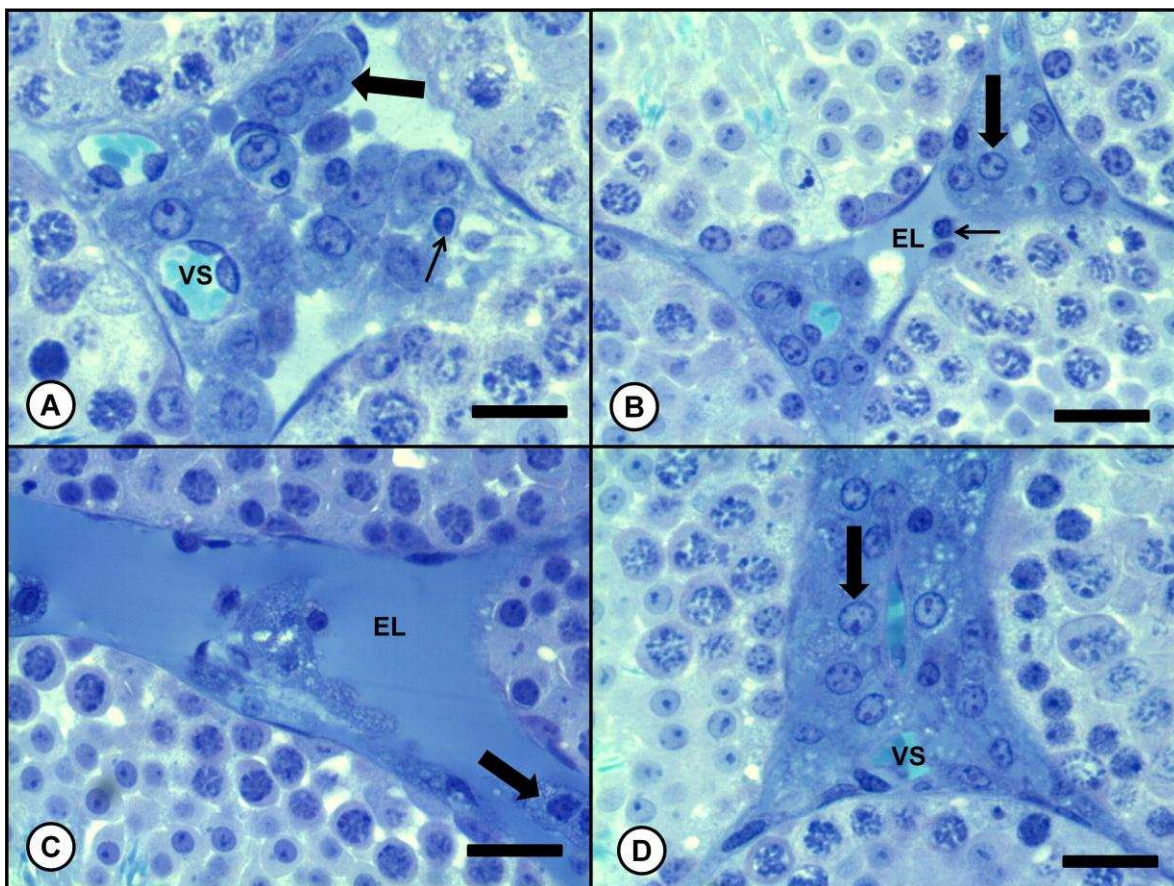


Figura 1: Fotomicrografias do ambiente intertubular do testículo de camundongos adultos do grupo tratado com água (A) DMSO (B) e com 300 (C) e 400mg/Kg (D) de peso corporal do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*. Em C, observa-se o aumento de espaço linfático. Setas largas: célula de Leydig; setas finas: macrófago; VS: vaso sanguíneo; EL: espaço linfático. Barras: A = 15 μ m; B, C e D = 30 μ m. Coloração: azul de toluidina/borato de sódio.

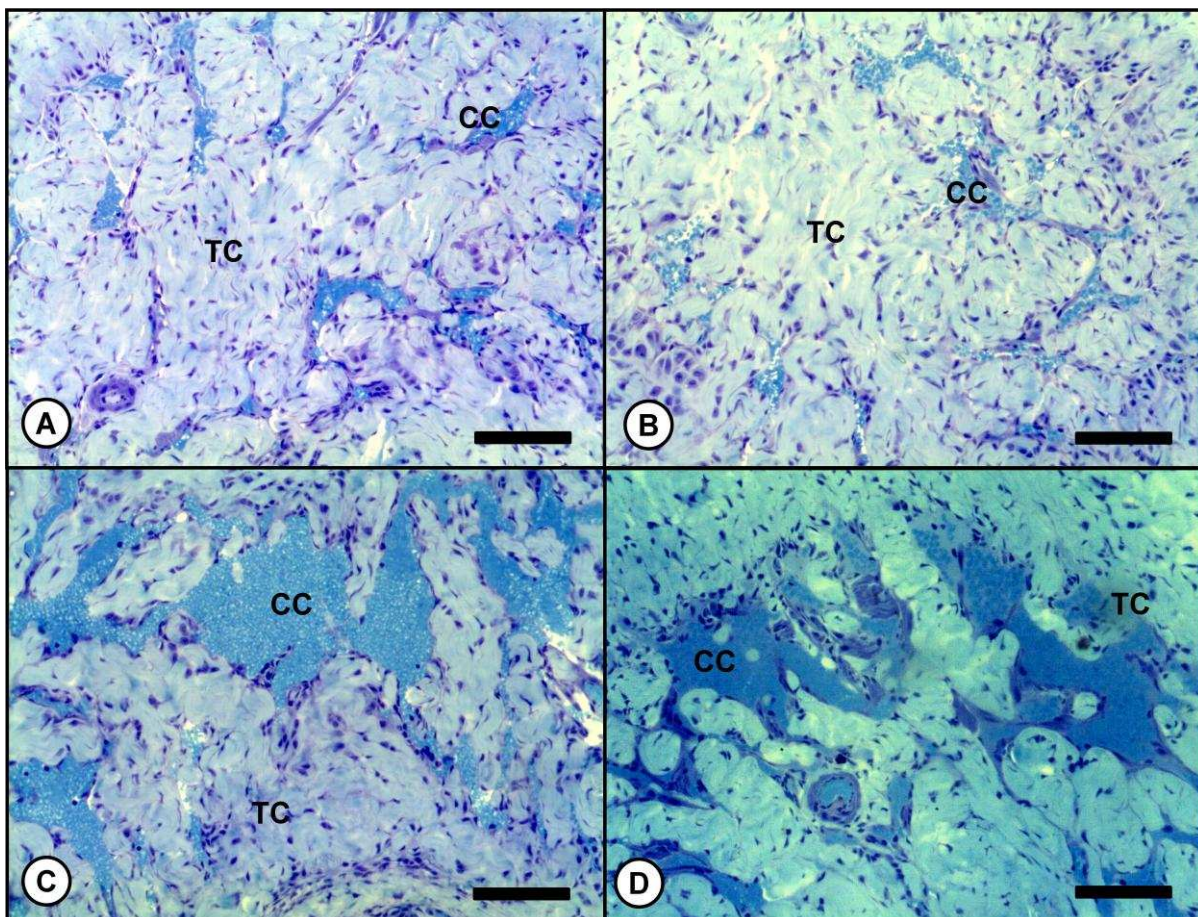
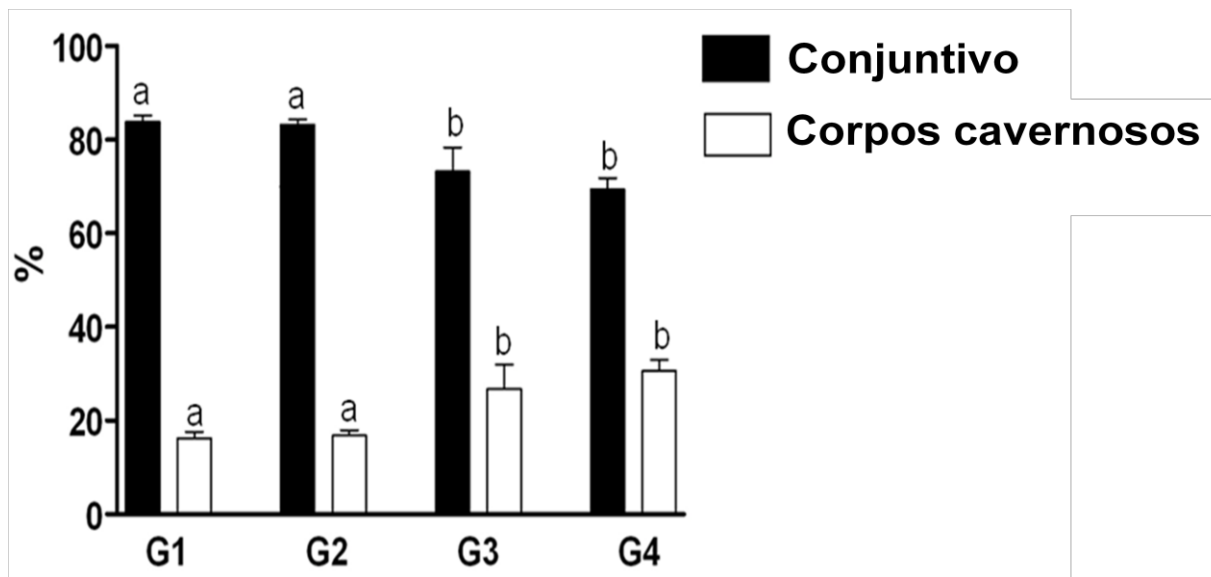


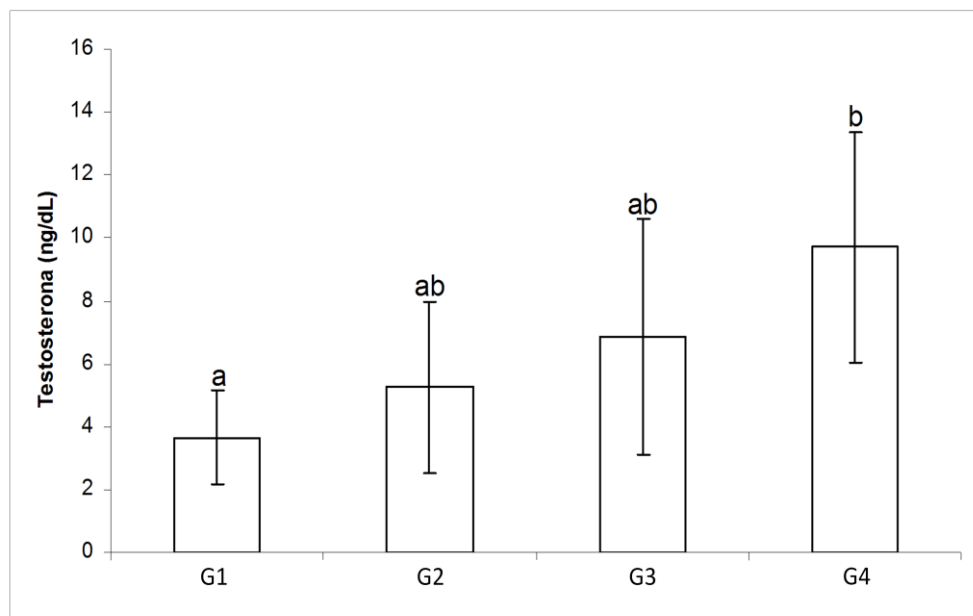
Figura 2: Fotomicrografias dos corpos cavernosos (CC) e tecido conjuntivo (TC) de camundongos do grupo tratado com água (A) DMSO (B) e com 300 (C) e 400mg/Kg (D) de peso corporal do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*. Em C e D observa-se expressiva dilatação dos corpos cavernosos. Barra: 70μm. Coloração: azul de toluidina/borato de sódio.

Figura 3: Proporção de corpos cavernosos e tecido conjuntivo no pênis de camundongos adultos após o tratamento com o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.



Letras diferentes nas barras, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

Figura 4: Concentração de testosterona sérica em camundongos adultos após o tratamento com o extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.



Letras diferentes nas barras, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). G1: controle; G2: DMSO; G3: EHRPG 300 mg/Kg; G4: EHRPG 400 mg/Kg.

CONCLUSÕES GERAIS

► O tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata* teve efeitos negativos para a espermatogênese de camundongos, produzindo alterações patológicas nas células de Sertoli e nas células germinativas com alto índice de células germinativas apoptóticas. As alterações observadas foram dose dependentes.

► As mesmas doses do extrato não interferiram nas células de Leydig e demais elementos do ambiente intertubular.

► Houve aumento na concentração de testosterona sérica nos animais que receberam maior concentração do EHRPG.

► Os corpos cavernosos dos animais tratados se apresentaram expressivamente dilatados, indicando uma possível ação vasodilatadora.