

MARCOS DE LUCCA MOREIRA GOMES

**MORFOMETRIA TESTICULAR DE RATOS WISTAR ADULTOS
TRATADOS COM INFUSÃO AQUOSA DE CATUABA (*Trichilia catigua* A.
Juss. MELIACEAE)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

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

T

G633m
2007

Gomes, Marcos de Lucca Moreira, 1982-
Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com
infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae)
/ Marcos de Lucca Moreira Gomes. – Viçosa : UFV, 2007.
ix, 38f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 29-38.

1. Reprodução. 2. Plantas medicinais - Pesquisa. 3. Ervas - Uso
terapêutico. 4. Catuaba - Efeito fisiológico. 5. Aparelho genital -
Efeito das drogas. 6. Espermatogênese em animais. 7. Rato como
animal de laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571. 833

MARCOS DE LUCCA MOREIRA GOMES

**MORFOMETRIA TESTICULAR DE RATOS WISTAR ADULTOS
TRATADOS COM INFUSÃO AQUOSA DE CATUABA (*Trichilia catigua* A.
Juss. MELIACEAE)**

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

APROVADA: 2 de fevereiro de 2007

Prof. Dr. Tarcízio A. R. de Paula
(Co - Orientador)

Prof. Dr. Cláudio C. Fonseca
(Co - Orientador)

Prof. Dr. Germán A. B. Mahecha

Prof^a Dr^a Izabel R. S. C. Maldonado

Prof. Dr. Sérgio Luis P. da Matta
(Orientador)

“Para ser um eterno aprendiz da vida é preciso morrer um pouco a cada noite e renascer um pouco a cada manhã, prometer um pouco a si e cumprir muito aos outros, condenar o que julga ser errado e perdoar quem merece ser perdoado, esquecer o que não deve ser lembrado e lembrar o que não deve ser esquecido, fazer prisioneiros o afeto, o carinho e o amor-próprio e libertar os sentimentos vazios e as palavras sem sentido, ficar sozinho para encontrar os pedaços que perdeu para depois voltar a se perder e se misturar e se multiplicar e se dividir e se subtrair e se somar...”

(André Luis Aquino)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, calma e perseverança para suportar e enfrentar todos os momentos adversos.

Aos meus pais, por todo o amor e exemplo de vida, por todos os valores transmitidos e por me darem força... sempre! E também pelo esforço financeiro durante essa caminhada!

À Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio e investimento durante todos esses anos de graduação e mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento ao projeto e pela bolsa fornecida durante o período de mestrado.

Ao Sérgio, que além de professor e orientador sempre foi muito mais que um amigo e companheiro. A todos os momentos que passamos juntos no laboratório e fora dele, momentos estes inesquecíveis e prazerosos.

Aos professores Tarcízio e Cláudio, pela paciência, pela amizade, ensinamentos e ajuda na elaboração deste projeto.

Ao Departamento de Nutrição e Saúde, em especial à Professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, por nos fornecer todas as condições necessárias para o manejo dos animais junto ao Biotério do seu departamento. Ao técnico Cassiano, por disponibilizar tempo e cuidados imprescindíveis para o bom andamento do projeto.

Aos Departamentos de Biologia Geral e Veterinária, que nos acolheram durante todo o curso de Mestrado, tornando possível a realização deste e de outros trabalhos.

A todos os professores do laboratório de Biologia Estrutural, Izabel, Clóvis, Lino e Adílson, pelos ensinamentos, momentos de descontração e exemplo de profissionalismo.

Aos amigos de laboratório, alguns já em outras universidades: Vinícius, Alex, Fabiana, Lílian, Polyana, Pedro, Mariana, Diego, Juliana, Fabíola, Jesy, Letícia, Max, Cláudia, Sirlene, Renan, Katiane, Charles e todas as outras pessoas que transitam diariamente pelo laboratório. Obrigado pelos momentos felizes que passamos juntos e por toda a demonstração de carinho.

Aos amigos de República: Diego, Bruno, Suzan, John, Luiza, Bruno, Ivan, Vinícius, Pedro, Bruno, Pedro e Ebert. Uén!!!

À Nara, Cláudia, Fernanda, Sabrina, Luisa e a todos os amigos de academia... com certeza meu porto seguro durante tantos anos de malhação e baladas. Eu acho pouco!

A todos... meu MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Marcos de Lucca Moreira Gomes, filho de Marcos Moreira Gomes e Maria da Paz de Lucca Gomes, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 19 de maio de 1982.

Em janeiro de 2005, graduou-se como Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. Durante a maior parte da graduação, de 2000 a 2004, foi estagiário do Laboratório de Histofisiologia Reprodutiva e Digestiva, do Departamento de Biologia Geral da UFRV.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a dissertação em fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Terapia da estimulação sexual – afrodisíacos.....	2
1.2. A <i>Trichilia catigua</i>	3
1.3. A Catuama®.....	4
1.4. O testículo.....	5
1.5. A célula de Leydig.....	7
2. Material e Métodos.....	10
2.1. Animais e tratamentos.....	10
2.2. Preparação do extrato aquoso de <i>Trichilia catigua</i>	10
2.3. Coleta de amostras.....	11
2.4. Microscopia de luz.....	11
2.5. Análise histométrica dos testículos.....	12
2.5.1. Índice Gonadossomático (%).....	12
2.5.2. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo.....	12
2.5.3. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos.....	13
2.5.4. Volume e número de células de Leydig por grama e peso total do testículo.....	14
2.6. Análises estatísticas	14
3. Resultados.....	16
4. Discussão.....	23
5. Conclusões.....	28
6. Referências Bibliográficas.....	29

RESUMO

GOMES, Marcos de Lucca Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae)**. Orientador: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Orientadores: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula e Cláudio César Fonseca.

Ao longo das últimas décadas tem aumentado a procura por substâncias de origem vegetal que possam atuar no sistema reprodutor auxiliando no desempenho das funções sexuais, principalmente de machos. Porém, pouco se tem feito para avaliar o efeito dessas substâncias nos órgãos reprodutores. Neste trabalho foram avaliados os efeitos dos extratos de *Trichilia catigua* e da solução de Catuama[®] sobre a biometria corporal, glândula vesicular, túbulos seminíferos e componentes do espaço intersticial testicular de ratos Wistar adultos. Os animais foram divididos em quatro grupos de 9 indivíduos cada, sendo um grupo controle, dois grupos que receberam infusão aquosa de catuaba (*T. catigua*; 36 e 72 mg/animal/dia) e um grupo que recebeu solução aquosa de Catuama[®] (0,7 mL/kg/animal/dia). Em todos os tratamentos observou-se manutenção das massas corporais, testiculares e de glândulas vesiculares, sendo que o índice gonadossomático apresentou aumento significativo em animais tratados com a solução de Catuama[®], em relação ao grupo tratado com a maior concentração de catuaba. Quando considerado o parênquima testicular, não foram observadas variações significativas com relação ao diâmetro, volume e comprimento de túbulos seminíferos, assim como da altura do epitélio seminífero. Os extratos e solução administrados promoveram diminuição significativa da proporção das células de Leydig e macrófagos em todos os animais tratados. Os volumes nuclear, citoplasmático e de cada célula de Leydig sofreram reduções importantes nos grupos tratados, bem como o volume total ocupado por estas células por grama e peso total testicular. Estes resultados mostram que as infusões ministradas durante o experimento causaram efeito deletério sobre a população e volume de células de Leydig nos testículos dos animais tratados.

ABSTRACT

GOMES, Marcos de Lucca Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2007. **Testicular morphometry of adult Wistar rats treated with aqueous infusion of catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae).** Adviser: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Advisers: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula and Cláudio César Fonseca.

Throughout the last decades, it was observed an increase of the search for substances of vegetal origin, which can act in the reproductive organs assisting in the performance of the sexual functions, mainly of males. However, a few works have been doing to evaluate the effect of those substances in the reproductive organs. The effect of the extracts of *Trichilia catigua* and the solution of Catuama[®] had been evaluated, based on the corporal biometric values, and on the morphometry of the vesicular gland, seminiferous tubules and components of the interstitial space, in the testes of adult Wistar rats. The animals had been separated in four groups of 9 individuals each, with one control group, two groups that had received watery catuaba (*T. catigua*) infusion (36 and 72 mg/animal/day) and a group that has received Catuama[®] watery solution (0.7 mL/kg/animal/day). In all the treatments, we observed the maintenance of the corporal, testicular and seminal vesicles weights, seeing that the gonadosomatic index presented significant increase in those animals dealt with the Catuama[®] solution, when compared as the group dealt with the higher concentration of catuaba. The testicular parenchyma didn't show significant variations in the diameter, volume and length of seminiferous tubules, as well as of the height of the seminiferous epithelium. The managed extracts and solution had promoted significant reduction of the ratio of the Leydig cells and macrophages in all treated animals. Nuclear and cytoplasmic volumes from each Leydig cells had suffered important reductions in the treated groups, as well as the total volume occupied by these cells per gram of testis and per testis. These results show that the given infusions caused a deleterious effect on the population and volume of Leydig cells in the testes of the animals.

1. Introdução

Há vários séculos as plantas vêm sendo empregadas na medicina popular para a prevenção e tratamento de doenças, em preparações tradicionais tais como chás, sucos, xaropes, cataplasmas, tinturas e unguentos. Atualmente, vem crescendo o interesse científico por pesquisas com plantas usadas na medicina popular, resultando em várias buscas sobre os seus princípios ativos puros (Pitman, 1996, Srivastava et al., 2005). O uso dessas plantas na terapêutica é impulsionado pela promessa da produção de medicamentos com preços mais acessíveis e pela grande aceitação dos produtos naturais pela população. Dessa forma, tornam-se importantes e necessários estudos criteriosos sobre estas espécies vegetais, para que haja comprovação ou não de seus efeitos terapêuticos ou farmacológicos e dos possíveis efeitos colaterais e/ou tóxicos.

Em 1978, cerca de 80% da população mundial utilizou algum tipo de planta na tentativa de aliviar sintomas dolorosos ou desagradáveis (Martins et al., 1995). O uso ponderado e racional das plantas medicinais pode ser considerado uma forma simples, de baixo custo e bastante eficaz de promover a saúde. Desta forma, as plantas têm grande importância no contexto terapêutico mundial, principalmente em países cujas populações não têm muito acesso a medicamentos tradicionais (Corrêa et al., 2000).

Apesar da riqueza de espécies potencialmente medicinais encontradas na flora brasileira, estudos científicos que abordam esse tema são ainda incipientes e insuficientes no Brasil (Ferreira, 1998). Há indicativos que justificam a necessidade de maior atenção ao desenvolvimento de pesquisas interdisciplinares na área de plantas medicinais, tanto de ordem econômica quanto social. Atualmente mais de 120 compostos de estrutura definida, obtidos somente a partir de 94 espécies vegetais, estão sendo utilizados globalmente como drogas. Desses compostos, 80% tiveram uso etnomédico idêntico ou relacionado ao uso atual do elemento ativo da planta (Fabricant & Farnsworth, 2001).

Segundo Grünwald (1996), o mercado mundial de fitoterápicos movimentou no ano de 1993 cerca de 12,4 bilhões de dólares, sendo os países europeus responsáveis por cerca de metade desse valor. Este fato

confirma a tendência de crescimento desse mercado, de forma expressiva e generalizada. Entende-se por fitoterápicos os medicamentos compostos por substâncias exclusivamente vegetais, ou seja, que não possuem misturas com substâncias sintéticas (Marques, 1997).

Maiores estímulos às pesquisas relacionadas à fitoterapia certamente tornariam disponíveis maior variedade de fitoterápicos no mercado, o que não só incrementaria a utilização por parte da população mais carente, como também poderia incentivar parcerias com prefeituras e com pequenos laboratórios nacionais. Segundo Trentini (1997), cerca de 50 milhões de brasileiros estavam excluídos do acesso a medicamentos, já na última década do século passado. Assim, a fitoterapia se apresenta como um método bastante vantajoso de tratamento de várias enfermidades.

1.1. Terapia da estimulação sexual

Segundo Sandroni (2001) os estimulantes sexuais podem ser classificados, pelo seu modo de ação, em 3 tipos: aqueles que aumentam a libido (1), a potência (2) e o prazer sexual (3). Este mesmo autor, revisando o assunto, encontrou que várias substâncias (de origem animal ou vegetal) têm sido utilizadas na medicina popular nos mais diferentes países, principalmente asiáticos, como a China. No Brasil, apesar da grande quantidade de plantas utilizadas como afrodisíacas, sabe-se muito pouco sobre sua ação e toxicologia.

A constante busca da resolução das disfunções sexuais, especialmente masculinas, tem levado à pesquisa e descoberta de drogas para essa finalidade que são colocadas no mercado a preços inacessíveis para grande parte da população com problemas dessa natureza. Dentre essas drogas são citadas o Viagra (Kloner, 1998; Sandroni, 2001), o Cialis e o Levitra (Swearingen & Klausner, 2005), o Ardorare ou Erosom (Eskeland et al., 1997), o Afrodor 2000 (Baumbusch et al., 1995), o Potensan Forte (Cooper et al., 1973), o Afrodex (Miller, 1968; Sobotka, 1969) e o Pasuma (Kunzfeld, 1966). Variedades diferentes de plantas e animais têm sido experimentalmente utilizadas como estimulantes da libido, potência ou prazer sexual em várias regiões do mundo. Entre as espécies vegetais

podem ser citadas: *Tribulus terrestris* (Adaikan et al., 2000), *Lepidium meyenii* (Zheng et al., 2000; Cicero et al., 2002; Gonzales et al., 2002), *Turnera diffusa* e *Pfaffia paniculata* (Arletti et al., 1999), *Trichopus zeylanicus* (Subramoniam et al., 1997), *Catha edulis* (Taha et al., 1995) e *Salvia haematodes* (Islam et al., 1991).

A busca de novos afrodisíacos assim como do conhecimento do modo de ação daqueles já largamente utilizados na medicina tradicional de vários países é uma preocupação global e tem levado cientistas de vários países, desenvolvidos ou não, a pesquisarem sobre o assunto.

1.2. *Trichilia catigua*

Também conhecida como catiguá vermelho, pau de resposta, caramuru e piratancara (Castellani, 2002; Ming & Corrêa Júnior, 2002), a espécie *Trichilia catigua* pertence à família *Meliaceae* que compreende 50 gêneros e mais de 1000 espécies de ervas, arbustos e árvores (Pirani, 1992). Em média as árvores possuem 10 m de altura, com ramos pubescentes e de coloração acinzentada, que se tornam glabros com a idade. Esta espécie apresenta folhas compostas, com 5 a 7 folíolos, curto-pedicelados, oblongo-elípticos, ápice acuminado, irregularmente agudos na base, de até 7 cm de comprimento. As flores são de coloração branco-amareladas; os frutos são do tipo cápsula, estreito-oblongo, com pêlos longos, rijos e amarelados, com aproximadamente 2 cm de comprimento, avermelhado e com apenas uma semente (Souza et al., 2001).

O uso de folhas, sementes, cascas e raízes de muitas plantas da família *Meliaceae* é descrito em preparações da medicina tradicional apresentando atividades antiviral, antihelmíntica, antitumoral, antiinflamatória e anti-reumática (Nores et al., 1997; Benencia et al., 1998). Populações indígenas utilizam plantas do gênero *Trichilia* para tratamento de malária, de afecções pulmonares e como febrífuga (Castellani, 2002).

A espécie registrada como sendo a verdadeira catuaba é a *Anemopaegma arvense* (Veil.) Stellfeld (Bignoniaceae) sendo suas raízes utilizadas para o preparo dos extratos com função de estimulante sexual. Entretanto, a espécie *T. catigua* é também largamente utilizada para este

fim. Os componentes químicos das duas espécies são inteiramente diferentes, embora a *T. catigua* seja também usada como estimulante sexual pela população. Deste modo, torna-se indispensável o uso de métodos bioquímicos para análise e certificação da qualidade e autenticidade do material usado para a preparação de extratos vendidos comercialmente. Para tanto, Beltrame et al. (2006) descrevem o método de HPLC (*Higher Performance Liquid Chromatography*) como sendo simples e seletivo na identificação e quantificação da cinconína lb, presente em *T. catigua*.

A espécie *T. catigua* tem distribuição pelo sudeste e sul do Brasil, penetrando também em Goiás e alcançando o nordeste da Argentina, o Paraguai e a Bolívia (Pennington et al., 1981). Por se tratar de espécie nativa em diversas regiões de Minas Gerais, especialmente em fragmentos de Mata Atlântica nas proximidades de Viçosa, esta planta foi escolhida para as avaliações experimentais.

1.3. A Catuama[®]

Algumas soluções contendo extrato de *T. catigua*, em associação com outros extratos vegetais tidos como estimulantes, são vendidas comercialmente. Dentre estas soluções destaca-se a Catuama[®], que possui em sua composição catuaba (*T. catigua*, 28,23%), guaraná (*Paullinia cupana*, 40,31%), muirapuama (*Ptycopetalum olacoides*, 28,23%) e gengibre (*Zinziber officinalis*, 3,26%). Esta solução mostrou ter efeito vasodilatador em corpos cavernosos de ratos, porquinhos-da-índia e coelhos (Cabrini & Calixto, 1997) e efeito antidepressivo em ratos submetidos a regime forçado de exercício (Campos et al., 2005). Antunes et al. (2001) observaram efeito relaxante no corpo cavernoso de coelhos tratados com Catuama[®], o qual foi relacionado à presença de *P. cupana* e *T. catigua* na solução. Entretanto, nenhum trabalho ainda relacionou o efeito desta solução sobre a morfofisiologia testicular.

1.4. O testículo

O testículo é uma glândula com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Esta túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos.

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos: o compartimento intertubular, ou intersticial e o compartimento tubular, ou de túbulos seminíferos (Russell et al., 1990, Ross et al, 2003). Os componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, responsáveis pela produção da testosterona, os vasos sangüíneos e espaços linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente por fibroblastos e macrófagos, estando estes diretamente associados às células de Leydig (Russell et al., 1990; Setchell, 1991, Hales, 2002). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França & Russell, 1998; Godinho, 1999), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente neste compartimento.

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Eles são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria envolve o túbulo seminífero, sendo composta de células mióides ou peritubulares e matriz extracelular. Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas em fase de proliferação.

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998). O comprimento total de túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: tamanho do testículo, diâmetro tubular e densidade volumétrica dos túbulos seminíferos. O camundongo,

por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por gônada (Bascom & Ostrud, 1925). No suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (França & Russell, 1998), para um peso testicular em torno de 300g (Okwun et al., 1996) enquanto que o coelho apresenta em média 62m para um peso testicular de 3g (Amann, 1970). Em geral, há de 10 a 15 metros de túbulos por grama de testículo em grande parte dos mamíferos já estudados (França & Russell, 1998).

A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (Attal & Courot, 1963; Godinho & Cardoso, 1979; Sinha Hikim et al., 1991; Russell et al., 1994; Muñoz et al., 1998). Embora o valor encontrado para o diâmetro tubular médio possa chegar a 550 μm em algumas espécies de marsupiais (Woolley, 1975), o valor tipicamente observado para a maioria dos amniotas varia de 180 a 300 μm (Roosen-Runge, 1977). Em espécies de laboratório ocorrem variações cíclicas no diâmetro tubular e um aumento do lúmen pode ser responsável pelo aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos (Wing & Christensen, 1982).

As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos e leptótenos), e o adluminal, onde se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. O ambiente adluminal está totalmente sob controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e imunoprivilegiado, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994). No lume tubular encontram-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém-espermiados.

A espermatogênese pode ser dividida didaticamente em três fases, de acordo com as diferentes características funcionais: (a) fase proliferativa (espermatogonial), caracterizada por divisões rápidas e sucessivas (mitoses)

das espermatogônias; (b) fase meiótica, que envolve a síntese de DNA no espermatócito em pré-leptóteno, síntese de RNA no espermatócito em paquíteno e finalização da meiose, durante a qual ocorre uma divisão reducional, acompanhada de recombinação gênica e uma divisão equacional na qual, teoricamente, cada espermatócito em paquíteno dará origem a quatro espermátides haplóides; (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por profundas mudanças estruturais e bioquímicas e diferencia-se em espermatozóide, um tipo celular estruturalmente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (Sharpe, 1994).

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre estes dois tipos celulares, incluindo-se os desmossomos, as junções do tipo “gap”, as junções à base de actina. Apesar de serem postuladas várias funções para estes componentes juncionais, existem ainda poucas evidências experimentais para apoiar o papel preciso dos mesmos (Russell & Griswold, 1993). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1991; Daduone & Demoulin, 1993; Jégou, 1993; Spiteri-Grech & Nieschlag, 1993; Pescovitz et al., 1994; Russell et al., 1994; Schlatt et al., 1997; França & Russell, 1998). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e células mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

1.5. A célula de Leydig

As células de Leydig foram descritas pela primeira vez pelo pesquisador Franz Leydig, em 1850, em um estudo comparativo da histologia reprodutiva de algumas espécies de mamíferos. Entretanto, somente com o avanço das técnicas de microscopia no final do século XIX tornou-se possível observar com mais precisão e detalhes tais células

(Christensen, 1996). Elas apresentam formato poligonal, com diâmetro de cerca de 20 μ m; seu núcleo é esférico, contendo grande parte da cromatina em seu estado condensado e um ou dois nucléolos (Pelliniemi et al., 1996).

As células de Leydig possuem caráter eosinofílico, devido principalmente à grande quantidade de retículo endoplasmático liso e gotículas de gordura em seu citoplasma (Ross et al., 2003). Em ratos, essas células estão intimamente associadas com os vasos sanguíneos presentes no espaço intertubular e cercadas por espaço linfático (Fawcett et al., 1973).

A célula de Leydig é bastante conhecida devido à sua principal função de produção de andrógenos, principalmente testosterona e diidrotestosterona, que têm grande importância na diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996). Além disso, esses dois hormônios também estão relacionados com o surgimento dos caracteres sexuais secundários e a manutenção do processo espermatogênico normal (Sharpe, 1994; Ross et al., 2003).

No início do desenvolvimento, a célula de Sertoli, responsável pela manutenção do processo espermatogênico no epitélio seminífero, regula a proliferação das células de Leydig, assim como a produção de hormônios esteróides por estas células. Já em animais adultos é o LH (Hormônio Luteinizante) o principal regulador e estimulador da síntese de testosterona (Cooke, 1996; Sylvester, 1996). Além da célula de Sertoli, outro tipo celular comumente encontrado em associação com as células de Leydig é o macrófago. Em testículos de animais adultos, os macrófagos intersticiais podem ser incorporados aos agrupamentos de células de Leydig. Esta interação pode estar relacionada à transformação, por parte do macrófago, de alguns esteróides produzidos pela célula de Leydig, com a consequente produção e liberação de testosterona e diidrotestosterona (Hales, 1996).

Neste trabalho, objetivamos analisar os efeitos do extrato aquoso de catuaba (*Trichilia catigua*) e da Catuama[®] sobre os testículos de ratos Wistar adultos, avaliando quantitativamente, através de análises histométricas, possíveis alterações nas estruturas testiculares quanto a (ao):

- Índice Gonadossomático (IGS);
- Proporção volumétrica entre túbulos seminíferos e tecido intersticial;

- Volume de túbulos seminíferos e tecido intersticial;
- Diâmetro e comprimento total dos túbulos seminíferos;
- Proporção volumétrica dos elementos intersticiais;
- Volume ocupado pelos elementos intersticiais no testículo;
- Peso do parênquima testicular;
- Altura do epitélio seminífero;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Volume total de células de Leydig por grama e peso total do testículo;
- Número total de células de Leydig por grama e peso total do testículo.

2. Material e métodos

2.1. Animais e tratamentos

Foram utilizados 36 ratos Wistar em idade reprodutiva (100 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram divididos em quatro grupos de 9 indivíduos cada. Todos os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais, sendo um grupo controle, que recebeu apenas água (grupo I), dois grupos que receberam infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua*) nas concentrações de 36 e 72 mg/animal/dia (grupos II e III, respectivamente) e um grupo que recebeu solução aquosa de Catuama[®] (grupo IV), na quantidade indicada pelo fabricante (0,7 ml/kg/animal/dia). Diariamente foi medido o volume de solução ingerido, por animal, a fim de se controlar a concentração recebida individualmente. As soluções eram trocadas todos os dias e os frascos eram higienizados a cada dois dias com água destilada.

A Catuama[®] foi adquirida no comércio local e os frascos utilizados pertenciam, respectivamente, aos lotes nº 11.720 e 12.066. Toda a alimentação foi fornecida *ad libitum* (ração comercial).

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 25°C e luminosidade de 12h, localizado no prédio do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

O experimento teve duração de 56 dias consecutivos e os animais foram avaliados nas suas condições biométricas e eutanasiados ao final do período de tratamento.

2.2. Preparo da infusão aquosa de *Trichilia catigua*

As cascas de catuaba foram obtidas na Mata da Silvicultura (20°45'S e 42°55'W) localizada no Campus da Universidade Federal de Viçosa, durante o mês de julho de 2005, período no qual a produção e a concentração de flavonóides e de óleos essenciais são máximas na casca, segundo Castellani (2002). As plantas foram identificadas pelo Dr. Agostinho

Lopes de Souza, professor do Departamento de Engenharia Florestal da UFV. As cascas foram coletadas, limpas e secas em estufa (37°C), durante 24 horas. Depois da secagem, o material foi triturado em moinho de facas, embalado a vácuo e protegido da incidência direta de luz. As cascas eram pesadas e colocadas em água destilada a 100°C, por 4 horas. A infusão era preparada a cada dois dias e mantida sob refrigeração (4°C) depois de esfriar a temperatura ambiente.

2.3. Coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados após 56 dias de experimento, no Laboratório de Histologia, pelo método de perfusão. Os animais foram anestesiados com éter, contidos e pesados para posterior perfusão. Para fixação do material foi usado glutaraldeído 3% em tampão fosfato de sódio 0,1 molL⁻¹, pH 7,4.

Após a perfusão foram retirados os testículos e glândulas vesiculares que foram pesados em balança digital de precisão (0,001 g). Todos os órgãos coletados foram imersos em glutaraldeído 3% em tampão fosfato de sódio 0,1 molL⁻¹, pH 7,4, por 24 horas, sob refrigeração. Um dos testículos foi destinado às análises morfológicas e morfométricas. O testículo contralateral teve sua albugínea removida e pesada, para se calcular a massa do parênquima testicular.

2.4. Microscopia de luz

Os fragmentos de testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (50°, 70°, 80°, 95° e 100° GL), com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, procedeu-se a pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin[®] Leica). Cortes de 3µm foram feitos em micrótomo rotativo (Reichert Jung 2045), utilizando navalhas de vidro. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com resina (Entellan - Merck) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50).

2.5. Análise histométrica dos testículos

2.5.1. Índice Gonadossomático (%)

Com base na massa corporal e testicular, registrados após a eutanásia dos animais, foi obtido o índice gonadossomático (IGS) calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = \text{MG} / \text{MC} \times 100$$

Onde:

MG = massa total das gônadas;

MC = massa corporal.

2.5.2. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo

Uma vez que o testículo pode ser dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, as proporções volumétricas entre estes componentes foram estimadas utilizando um retículo com 121 intersecções (pontos) acoplado à ocular do microscópio, e contando-se 2000 pontos por animal, em aumento de 400X (Fig. 1A). Do compartimento intertubular foram consideradas as células de Leydig, macrófagos e tecido conjuntivo, vasos sangüíneos e espaço linfático. As proporções volumétricas destes elementos foram obtidas a partir da contagem de 1000 pontos por animal, em aumento de 400X (Fig. 1C). Todos os campos amostrados foram escolhidos aleatoriamente, varrendo-se toda a extensão do corte histológico.

Foram contados 1000 pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma deste tipo celular.

O volume de cada componente testicular (mL) foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo. O peso líquido testicular (massa do parênquima) foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo, o peso da albugínea. Como a densidade volumétrica do testículo é em torno de 1 (Johnson & Neaves, 1981; França, 1991; Paula,

1999; Tae et al., 2005), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume.

2.5.3. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno circular. Essas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero e foram realizadas utilizando-se programa de análise de imagem (Image Pro Plus), em aumento de 200x. As mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foram usadas na mensuração da altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da túnica própria até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio seminífero, em cada túbulo, representou a média de quatro medidas tomadas de forma diametralmente opostas (Fig. 1B).

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula (Attal & Courot, 1963; Dorst & 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).

Para o cálculo do comprimento tubular por grama de testículo, dividiu-se o valor encontrado para o CT pela massa testicular total.

2.5.4. Volume e número de células de Leydig por grama e peso total do testículo

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi realizado utilizando-se retículo com 121 interseções (pontos), acoplado à ocular do microscópio, em aumento de 1000X.

O diâmetro nuclear médio (DM) destas células foi medido em aumento de 1000X. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal, utilizando-se programa de análise de imagens (Image Pro Plus). Os núcleos medidos foram aqueles que apresentaram contorno esférico e cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. Foram calculados o volume nuclear, o volume do citoplasma e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig, por animal. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

Volume nuclear = $4/3\pi R^3$ onde, R = raio nuclear;

Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear /% núcleo;

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático.

Obtido o volume individual da célula de Leydig e o volume total (mL) ocupado por estas células no testículo, foram calculados o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, para cada animal.

2.6. Análises estatísticas

As médias dos parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de Duncan. Foi utilizado o software STATISTICA for Windows 3.11, sendo o nível de significância $p < 0,05$.

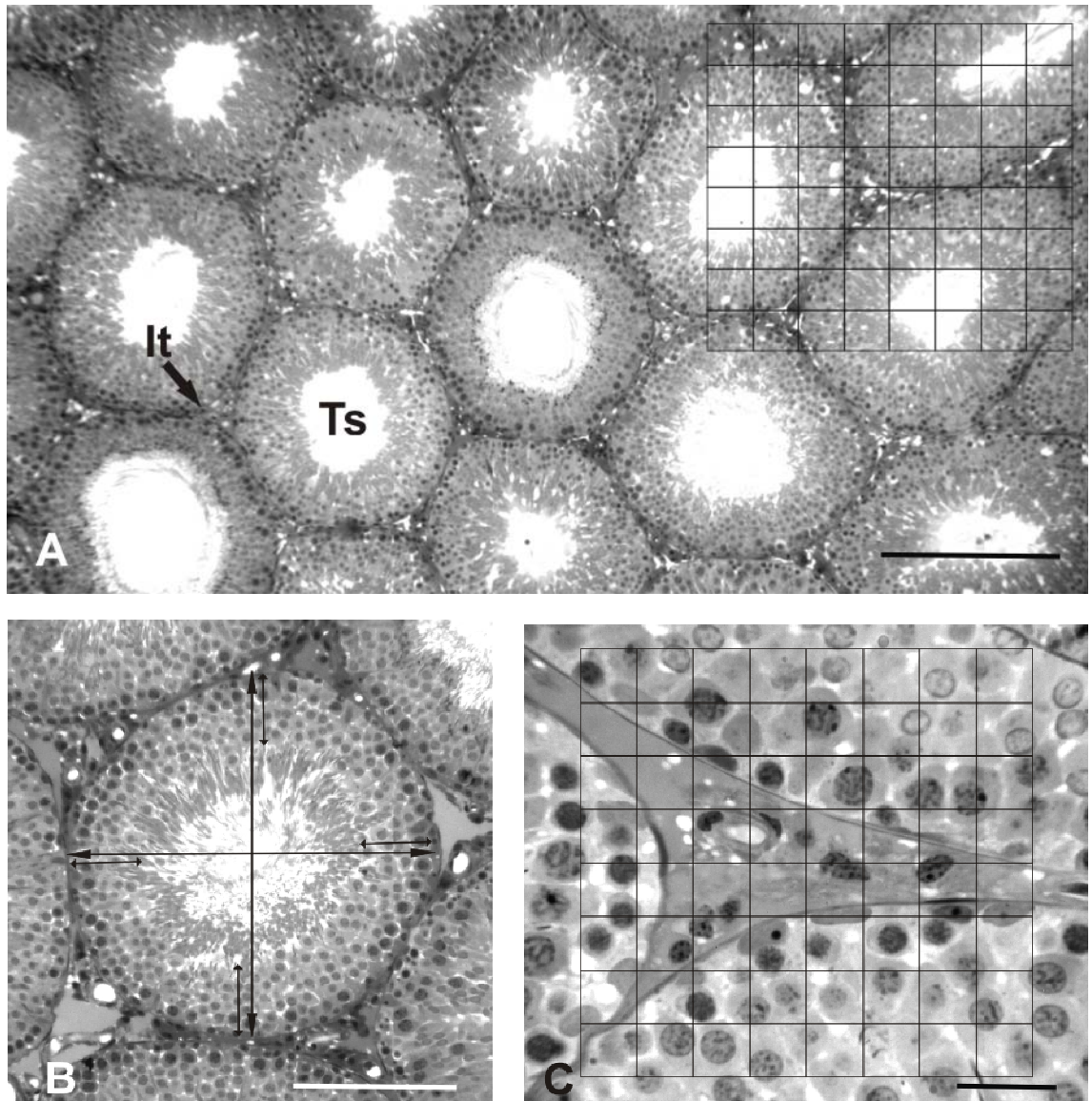


Figura 1. Corte transversal de testículo de ratos Wistar adultos. **A-** Organização do parênquima testicular em túbulos seminíferos (Ts) e espaço intersticial (It). Em detalhe (canto superior direito), um modelo de grade usado para análise morfométrica dos túbulos e interstício. **B-** Corte de túbulo seminífero mostrando os pontos usados para medir o diâmetro tubular (setas grandes) e a altura do epitélio seminífero (setas pequenas). **C-** Modelo de grade usado para registrar as proporções volumétricas dos componentes do interstício. It = espaço intersticial; Ts = túbulo seminífero. Barras: A = 300 μm ; B = 150 μm e C = 25 μm .

3. Resultados

Os valores médios de peso corporal apresentaram aumento nos dois grupos tratados com infusão de *T. catigua* (grupos II e III) e redução naqueles animais que receberam Catuama[®] (grupo IV). Entretanto, não se observou variação significativa ($p>0,05$) entre estes valores. Houve aumento do peso testicular ($p>0,05$) em todos os grupos tratados, sendo maior no grupo IV. Houve também aumento do peso da glândula vesicular nos animais que receberam catuaba, porém o grupo IV apresentou diminuição no peso glandular (Tab. 1). Entretanto, foi significativo o aumento do IGS médio nos animais que receberam Catuama[®] (grupo IV), quando comparados àqueles que receberam maior concentração de infusão de *T. catigua* (grupo III), cujo IGS apresentou-se significativamente reduzido comparado a todos os grupos. Observou-se aumento significativo do peso da albugínea nos animais do grupo III, quando comparados àqueles que receberam menor concentração do extrato vegetal (grupo II) (Tab. 1).

Tabela 1. Dados biométricos de ratos Wistar machos adultos tratados com extrato aquoso de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®].

Grupos	Massa corporal (g)	Massa testicular (g)	Massa da albugínea (g)	Massa da glândula vesicular (g)	IGS (%)
Controle	426,5 ± 48,29 ^a	2,91 ± 0,27 ^a	0,09 ± 0,02 ^{ab}	1,32 ± 0,17 ^a	0,70 ± 0,10 ^{ab}
Tc32mg	429,61 ± 46,38 ^a	2,92 ± 0,19 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	1,38 ± 0,25 ^a	0,69 ± 0,10 ^{ab}
Tc72mg	448,68 ± 32,25 ^a	2,96 ± 0,26 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	1,33 ± 0,14 ^a	0,66 ± 0,06 ^b
Catuama [®]	407,67 ± 42,56 ^a	3,08 ± 0,19 ^a	0,09 ± 0,02 ^{ab}	1,26 ± 0,16 ^a	0,76 ± 0,09 ^a

Valores agrupados por média ± desvio padrão; Para todos os grupos $n=9$.

Médias, nas colunas, seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$), pelo teste de Duncan. Controle: água destilada; Tc36mg: infusão de *T. catigua* 36mg/animal/dia; Tc72mg: infusão de *T. catigua* 72mg/animal/dia; Catuama[®]: solução de Catuama[®] 0,7mL/kg/animal/dia.

A relação túbulo/interstício não variou significativamente entre os diferentes tratamentos. A massa do parênquima testicular apresentou aumento não significativo ($p>0,05$) nos grupos II, III e IV, sendo a maior média atribuída ao grupo tratado com Catuama[®] (Tab. 2). O volume dos túbulos seminíferos no parênquima testicular apresentou-se aumentado em todos os tratamentos, porém de forma não significativa ($p>0,05$) (Tab. 2).

Tabela 2. Relação túbulo/interstício (%), massa do parênquima testicular (g) e volume tubular total (mL) de ratos Wistar adultos tratados com extrato aquoso de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®].

Grupos	Túbulo seminífero (%)	Tecido Intersticial (%)	Massa do parênquima testicular (g)	Volume tubular total (mL)
Controle	89,33 ± 2,09 ^a	10,67 ± 2,09 ^a	2,822 ± 0,242 ^a	2,522 ± 0,224 ^a
Tc36mg	89,48 ± 2,92 ^a	10,52 ± 2,92 ^a	2,836 ± 0,178 ^a	2,537 ± 0,176 ^a
Tc72mg	89,80 ± 2,17 ^a	10,20 ± 2,17 ^a	2,856 ± 0,245 ^a	2,565 ± 0,232 ^a
Catuama [®]	88,44 ± 2,02 ^a	11,56 ± 2,02 ^a	2,987 ± 0,182 ^a	2,642 ± 0,172 ^a

Valores agrupados por média ± desvio padrão; Para todos os grupos $n=9$.

Médias, nas colunas, seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$), pelo teste de Duncan. Controle: água destilada; Tc36mg: infusão de *T. catigua* 36mg/animal/dia; Tc72mg: infusão de *T. catigua* 72mg/animal/dia; Catuama[®]: solução de Catuama[®] 0,7mL/kg/animal/dia.

Quando considerado somente o parênquima tubular, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) no diâmetro tubular, na altura do epitélio seminífero e comprimento tubular por testículo e por grama de testículo (Tab. 3).

Foi observada redução ($p<0,05$) nos valores médios das populações de células de Leydig e macrófagos, nos três grupos tratados (grupos II, III e IV) em relação ao grupo controle (Tab. 4). Houve diminuição significativa da proporção de vasos sanguíneos nos animais que receberam solução de Catuama[®] (grupo IV) quando comparados àqueles que receberam infusão de *T. catigua* 300mg (grupo II).

O espaço linfático apresentou-se aumentado ($p<0,05$) nos animais que receberam Catuama[®] em relação aos grupos I, II e III enquanto nos animais do grupo III houve também aumento significativo desse espaço comparado ao grupo controle (Fig. 2 e Tab. 4).

O maior valor observado para a proporção volumétrica de tecido conjuntivo foi registrado nos animais tratados com infusão de *T. catigua* em sua menor concentração (grupo II), sendo significativo ($p<0,05$) em relação aos outros tratamentos. Animais do grupo III também apresentaram proporção de tecido conjuntivo significativamente maior em relação ao grupo controle (grupo I) e ao grupo Catuama[®] (IV) (Tab.4).

Tabela 3. Diâmetro tubular (μm), altura do epitélio seminífero (μm), comprimento tubular (m), comprimento tubular por grama de testículo e volume total de túbulos seminíferos (mL) em ratos Wistar machos adultos após tratamento com extrato aquoso de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®].

Grupos	Diâmetro tubular (μm)	Altura do epitélio (μm)	Comprimento tubular total (m)	Comprimento tubular/g de testículo
Controle	333,03 \pm 20,74 ^a	104,24 \pm 8,01 ^a	29,16 \pm 3,63 ^a	10,04 \pm 1,08 ^a
Tc36mg	329,25 \pm 13,02 ^a	104,21 \pm 6,78 ^a	29,89 \pm 2,68 ^a	10,26 \pm 0,84 ^a
Tc72mg	332,64 \pm 7,61 ^a	103,04 \pm 4,99 ^a	29,53 \pm 2,70 ^a	9,97 \pm 0,38 ^a
Catuama [®]	332,49 \pm 18,28 ^a	106,40 \pm 6,01 ^a	30,81 \pm 4,87 ^a	9,98 \pm 1,27 ^a

Valores agrupados por média \pm desvio padrão; Para todos os grupos $n=9$.

Médias, nas colunas, seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$), pelo teste de Duncan. Controle: água destilada; Tc36mg: infusão de *T. catigua* 36mg/animal/dia; Tc72mg: infusão de *T. catigua* 72mg/animal/dia; Catuama[®]: solução de Catuama[®] 0,7mL/kg/animal/dia.

Tabela 4. Proporção volumétrica (%) dos componentes intersticiais dos testículos de ratos Wistar machos adultos após tratamento com extrato aquoso de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®]. Células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo.

Grupos	Células de Leydig (%)	Macrófagos (%)	Vasos sanguíneos (%)	Espaço linfático (%)	Tecido conjuntivo (%)
Controle	30,99 ± 1,23 ^a	9,17 ± 2,87 ^a	25,08 ± 9,09 ^{ab}	30,59 ± 10,66 ^c	4,17 ± 2,81 ^c
Tc36mg	17,83 ± 3,86 ^b	6,17 ± 3,29 ^b	30,50 ± 6,24 ^a	36,40 ± 7,27 ^{bc}	9,10 ± 2,77 ^a
Tc72mg	17,82 ± 6,15 ^b	6,24 ± 3,14 ^b	27,38 ± 9,91 ^{ab}	41,96 ± 9,46 ^b	6,60 ± 1,85 ^b
Catuama [®]	19,30 ± 5,21 ^b	4,04 ± 1,07 ^b	20,91 ± 6,62 ^b	52,29 ± 8,68 ^a	3,46 ± 1,38 ^c

Valores agrupados por média ± desvio padrão; Para todos os grupos $n=9$.

Médias, nas colunas, seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$), pelo teste de Duncan. Controle: água destilada; Tc36mg: infusão de *T. catigua* 36mg/animal/dia; Tc72mg: infusão de *T. catigua* 72mg/animal/dia; Catuama[®]: solução de Catuama[®] 0,7mL/kg/animal/dia.

Observou-se redução significativa do diâmetro nuclear médio das células de Leydig em todos os grupos tratados (grupos II, III e IV) que, no entanto, não diferiram entre si (Tab. 5). Houve redução do citoplasma ($p<0,05$) das células de Leydig nos animais do grupo II quando comparados aos animais dos outros tratamentos, que não diferiram entre si. Por outro lado, os animais do grupo II apresentaram aumento da proporção nuclear ($p<0,05$) o que não aconteceu com animais dos grupos I, III e IV (Tab. 5).

Os volumes nucleares das células de Leydig (μm^3) apresentaram-se significativamente menores ($p<0,05$) nos animais tratados com extrato de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®] (grupos II, III e IV) (Tab. 6). O volume citoplasmático destas células também apresentou valores médios menores nos animais dos grupos tratados com relação ao grupo controle, embora tenha sido significativo ($p<0,05$) apenas para os animais do grupo II (Tab. 6).

Tabela 5. Morfometria de células de Leydig. Diâmetro nuclear (μm), proporção entre citoplasma e núcleo (%) e relação nucleoplasmática (%) de células de Leydig, em ratos Wistar machos adultos após tratamento com extrato aquoso de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®].

Grupos	Diâmetro nuclear de Leydig (μm)	Citoplasma de Leydig (%)	Núcleo de Leydig (%)
Controle	7,46 \pm 0,45 ^a	74,26 \pm 2,00 ^a	25,74 \pm 2,00 ^a
Tc36mg	6,89 \pm 0,32 ^b	70,73 \pm 3,31 ^b	29,27 \pm 3,31 ^b
Tc72mg	6,96 \pm 0,51 ^b	74,36 \pm 2,86 ^a	25,64 \pm 2,86 ^a
Catuama [®]	6,94 \pm 0,51 ^b	75,49 \pm 3,59 ^a	24,51 \pm 3,59 ^a

Valores agrupados por média \pm desvio padrão; Para todos os grupos $n=9$.

Médias, nas colunas, seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$), pelo teste de Duncan. Controle: água destilada; Tc36mg: infusão de *T. catigua* 36mg/animal/dia; Tc72mg: infusão de *T. catigua* 72mg/animal/dia; Catuama[®]: solução de Catuama[®] 0,7mL/kg/animal/dia.

Tabela 6. Morfometria de células de Leydig. Volume nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig (μm^3) em ratos Wistar machos adultos após tratamento com extrato aquoso de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®].

Grupos	Células de Leydig		
	Volume nuclear (μm^3)	Volume citoplasmático (μm^3)	Volume de uma célula (μm^3)
Controle	219,57 \pm 35,00 ^a	636,54 \pm 113,57 ^a	856,11 \pm 143,03 ^a
Tc36mg	172,33 \pm 21,66 ^b	423,40 \pm 81,55 ^b	595,73 \pm 96,00 ^b
Tc72mg	179,26 \pm 36,64 ^b	530,37 \pm 136,65 ^{ab}	709,63 \pm 167,74 ^{ab}
Catuama [®]	177,85 \pm 34,26 ^b	583,79 \pm 221,01 ^a	761,64 \pm 252,36 ^{ab}

Valores agrupados por média \pm desvio padrão; Para todos os grupos $n=9$.

Médias, nas colunas, seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$), pelo teste de Duncan. Controle: água destilada; Tc36mg: infusão de *T. catigua* 36mg/animal/dia; Tc72mg: infusão de *T. catigua* 72mg/animal/dia; Catuama[®]: solução de Catuama[®] 0,7mL/kg/animal/dia.

Considerando o volume médio (mL) ocupado pelas células de Leydig, por testículo e por grama de testículo, observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) dessa variável nos animais de todos os tratamentos, exceto para o grupo IV (Catuama[®]) para o volume total de células de Leydig por testículo. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos (Tab. 7).

O número médio de células de Leydig por testículo e por grama de testículo não apresentou alterações significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tab. 7).

Tabela 7. Morfometria de células de Leydig. Volume total de células de Leydig (mL) por testículo e por grama de testículo e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, em ratos Wistar machos adultos após tratamento com extrato aquoso de *T. catigua* e solução aquosa de Catuama[®].

Grupos	Célula de Leydig			
	Volume total por testículo (mL)	Volume por grama de testículo (mL)	Número de células por testículo (10^6)	Número de células/g de testículo (10^6)
Controle	0,047 ± 0,023 ^a	0,033 ± 0,014 ^a	55,83 ± 265,40 ^a	38,72 ± 15,96 ^a
Tc36mg	0,026 ± 0,008 ^b	0,019 ± 0,006 ^b	44,35 ± 115,86 ^a	31,49 ± 8,42 ^a
Tc72mg	0,027 ± 0,012 ^b	0,018 ± 0,008 ^b	37,58 ± 142,01 ^a	26,25 ± 9,43 ^a
Catuama [®]	0,034 ± 0,013 ^{ab}	0,023 ± 0,008 ^b	48,43 ± 207,84 ^a	32,20 ± 13,24 ^a

Valores agrupados por média ± desvio padrão; Para todos os grupos $n=9$.

Médias, nas colunas, seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan. Controle: água destilada; Tc36mg: infusão de *T. catigua* 36mg/animal/dia; Tc72mg: infusão de *T. catigua* 72mg/animal/dia; Catuama[®]: solução de Catuama[®] 0,7mL/kg/animal/dia.

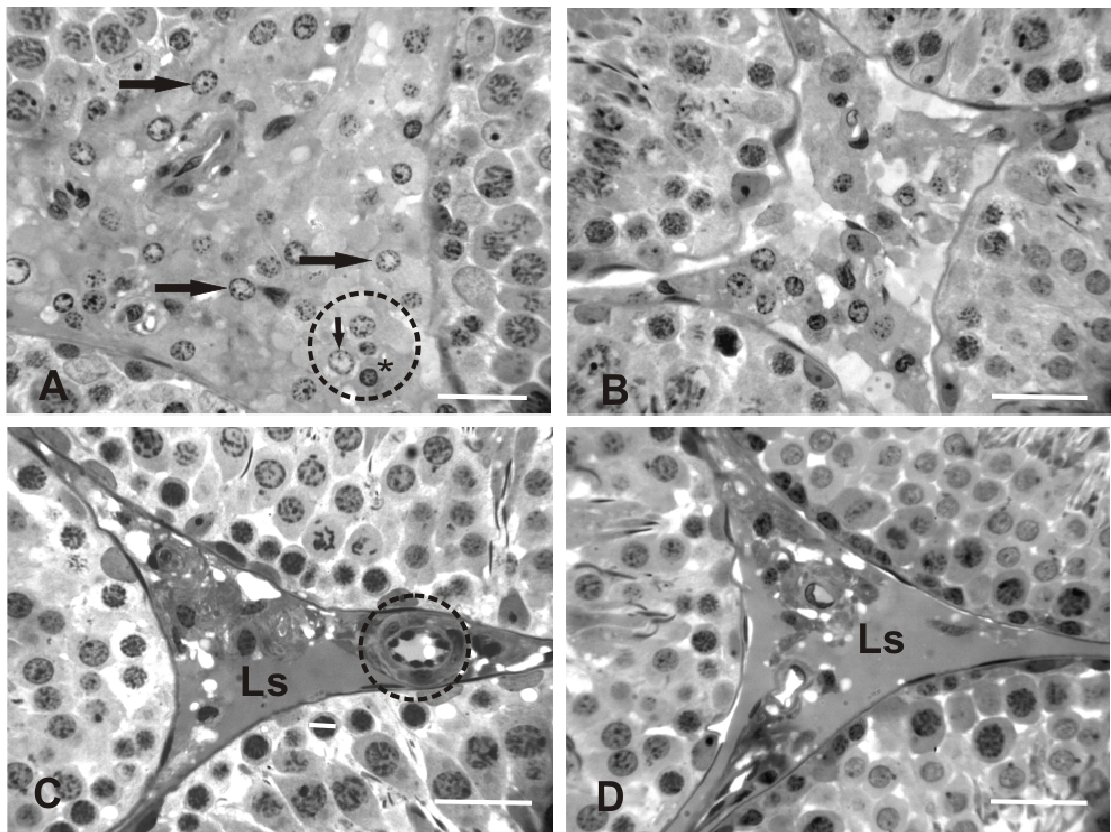


Figura 2. Parênquima testicular de ratos Wistar adultos. **A-** Grupo I (controle), onde se observa abundância de células de Leydig (setas) no interstício e pouca quantidade de espaço linfático. O círculo pontilhado mostra a íntima associação entre as células de Leydig (setas) e os macrófagos (asterisco). **B-D-** Nos grupos II (*T. catigua* 36mg), III (*T. catigua* 72mg) e IV (solução de Catuama[®]), observa-se aumento do espaço linfático e diminuição na quantidade de células de Leydig no interstício. Em **C**, detalhe no círculo pontilhado evidenciando um vaso sanguíneo, e em **C e D**, observa-se o espaço linfático (El) bem desenvolvido. El = espaço linfático. Barras: 25 μ m.

4. Discussão

De acordo com os nossos resultados, os animais tratados com os extratos de *T. catigua* e com solução de Catuama[®] não apresentaram diferenças significativas em relação à massa corporal. Tal padrão foi também observado em ratos adultos submetidos a tratamentos a base de piperina (Malini et al., 1999), extratos de *Barleria prionitis* e *Colebrookia oppositifolia* (Gupta et al., 2000), extratos de *Carica papaya* (Lohiya et al., 2005) e de *Butea superba* (Manosroi et al., 2006). Nestes estudos ocorreu diminuição da massa testicular nos animais tratados, devido ao efeito antiandrogênico de tais extratos vegetais, ao contrário do encontrado no presente experimento e em animais tratados com extrato de *Andrographis paniculata* (Burgos et al., 1997). Chieriegatto (2005) encontrou diferença no peso de animais tratados com *Heteropterys aphrodisiaca* e *Anemopaegma arvense*, relatando aumento da massa corporal, particularmente nos grupos tratados com a maior dose dos fitoterápicos.

Ao contrário do observado para animais tratados com extrato de *Stephania hernandifolia* (Ghosh et al., 2002), e de *B. superba* (Manosroi, 2006), não foram observadas diferenças significativas quanto ao índice gonadossomático (IGS) para os animais tratados com os extratos de *T. catigua*. Entretanto, ao comparar os IGS dos animais tratados com a maior concentração de *T. catigua* e os tratados com Catuama[®], observou-se aumento significativo do IGS médio para os animais tratados com esta última solução. Isto se deve à menor massa corporal média dos animais que receberam a solução de Catuama[®], aliado à maior massa testicular. Animais tratados com *H. aphrodisiaca* e *A. arvense*, que têm a mesma indicação fitoterápica que *T. catigua*, também não apresentaram diferenças significativas no IGS (Chieriegatto, 2005).

As glândulas vesiculares são sensíveis a alterações na produção e liberação de hormônios relacionados ao processo espermatogênico, como a testosterona, sendo que mudanças na massa desses órgãos podem ser indicadoras de alterações na produção hormonal. Não foi observada

mudança significativa do peso das glândulas vesiculares entre os grupos tratados com infusão de catuaba e Catuama[®]. Tratamentos utilizando-se piperina (Malini et al., 1999), *Colebrookia oppositifolia* (Gupta et al., 2001) e *Stephania hernandifolia* (Ghosh et al., 2002) demonstraram que houve redução da massa das glândulas vesiculares e queda da taxa de fertilidade nos animais que receberam tais infusões. Estes resultados corroboram a hipótese de manutenção de um processo espermatogênico normal para ratos tratados com as concentrações usadas dos extratos de *T. catigua* e a solução de Catuama[®].

O testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos funcionais: o tubular ou espermatogênico e o intersticial ou androgênico. A proporção entre estes dois compartimentos é bastante variável entre as espécies, sendo um dos principais fatores responsáveis pela eficiência da produção espermática (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998, Hales, 2002). A produção espermática é diretamente correlacionada com o peso testicular (Amann, 1970), e segundo Russell et al. (1990) e França & Russell (1998), a massa testicular pode ser utilizada como indicador quantitativo da produção espermática, pois o principal componente do testículo é o túbulo seminífero. Chieriegatto (2005) observou aumento significativo da proporção de interstício em relação ao espaço tubular em animais tratados com extratos aquosos de *H. aphrodisiaca*, o que não foi observado neste trabalho. As proporções entre túbulos seminíferos e tecido intersticial não apresentaram alterações significativas, embora tenha sido observado aumento significativo na proporção de espaço linfático em animais tratados com maior concentração de *T. catigua* e com a solução de Catuama[®].

Ratos albinos que receberam extrato alcoólico de *Momordica charantia* por via intraperitoneal apresentaram redução significativa no diâmetro tubular estando este resultado diretamente relacionado à diminuição da taxa de fertilidade dos animais tratados (Naseen et al., 1998). Essa redução também ocorreu em ratos submetidos a tratamentos a base de piperina (Malini et al., 1999). Chieriegatto (2005) observou aumento do diâmetro tubular e da altura do epitélio seminífero, especialmente nos animais tratados com *A. arvense*, indicando possível efeito estimulante do fitoterápico administrado. Porém, não houve qualquer variação em relação

ao volume tubular. Para o tratamento com infusões de catuaba e Catuama[®] não houve alteração significativa nesses mesmos parâmetros estando os valores dos grupos tratados muito próximos ao do grupo controle, o que nos leva a crer que sua administração não influenciou significativamente a fertilidade dos grupos experimentais.

A massa do parênquima testicular e o volume tubular não apresentaram alterações significativas nos grupos tratados, ao contrário do registrado por Chieregatto (2005) para as maiores doses de *A. arvensis* e *H. aphrodisiaca*. Este mesmo autor relata aumento do comprimento tubular em metros, por testículo e por grama de testículo em animais tratados com os extratos destas plantas. No presente trabalho não houve alteração nesses parâmetros e as médias dos grupos tratados se encontravam bem próximas do grupo controle.

A porção endócrina testicular é representada pelas células de Leydig que formam o espaço intertubular juntamente com outros componentes conjuntivos, como macrófagos e fibroblastos, além de vasos sanguíneos e linfáticos. Vários trabalhos têm descrito as relações entre células de Leydig e os componentes testiculares, como os macrófagos, células mióides e células de Sertoli (Skinner et al., 1991; Ichihara et al., 1993; 2001; Hales, 2002). Durante o desenvolvimento, as mudanças ocorridas na morfologia das células de Leydig e dos macrófagos ocorrem de maneira coordenada (Hales, 1996). O contato direto entre estas duas células permite que o macrófago auxilie regulando a produção de testosterona pela célula de Leydig. Foi observada redução significativa nas proporções destes dois tipos celulares nos testículos dos animais em todos os tratamentos. Provavelmente, devido a este fato, as proporções do espaço linfático, vaso sanguíneo e tecido conjuntivo apresentaram aumento em seus volumes médios. Chieregatto (2005) observou aumento significativo na proporção volumétrica de células de Leydig para animais tratados com *H. aphrodisiaca* e também para os outros componentes do intertúbulo, à exceção dos vasos linfáticos.

Estudos correlacionando estrutura e função de células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na síntese e secreção de testosterona dependem mais da capacidade individual desta célula do que do volume total delas no testículo (Ewing et al., 1979). Zirkin et

al. (1980) relataram que a capacidade produtiva das células de Leydig está intimamente associada à quantidade de retículo endoplasmático liso presente no seu citoplasma. Castro et al. (2002) propõem que, em coelhos, há correlação altamente significativa do percentual volumétrico do núcleo e do número de células de Leydig por grama de testículo, com os níveis plasmáticos e testiculares de testosterona. Foi observada redução significativa nos volumes do núcleo e do citoplasma, assim como do volume de uma célula de Leydig. Em consequência da diminuição dos volumes nucleares e citoplasmáticos, o volume médio de uma célula de Leydig também foi menor em todos os tratamentos, sendo significativamente relevante sua diminuição nos animais do grupo II. Entretanto, seriam necessários dados provenientes de morfometria de organelas (como o retículo endoplasmático liso) para constatar se houve aumento do volume dessas organelas como compensação da diminuição do volume citoplasmático.

Mudanças no desenvolvimento reprodutivo podem estar relacionadas à administração de compostos que afetam diretamente as células de Leydig (Mantovani et al., 2005). Chieriegatto (2005), testando os efeitos dos extratos de *A. arvense* e *H. aphrodisiaca* no testículo de ratos adultos, observou aumento na proporção volumétrica das células de Leydig no interstício, evidenciando possível efeito estimulante dos extratos destas plantas sobre esse tipo celular. Utilizando *T. catigua*, observamos diminuição na proporção (%) de células de Leydig, assim como no volume ocupado por estas células por grama e massa total do testículo, o que indica efeito deletério das infusões de catuaba e Catuama[®] sobre essas células.

Assim como foi observado por Gupta et al. (2000; 2001) trabalhando, respectivamente, com ação de *B. prionitis* e *C. oppositifolia* em ratos albinos, também foi registrada redução no volume nuclear e citoplasmático, assim como para o volume total das células de Leydig por testículo e por grama de testículo em todos os tratamentos. Estas reduções possivelmente estariam relacionadas à queda da taxa de fertilidade, pela redução da produção hormonal. Entretanto, outros parâmetros analisados, como diâmetro e volume tubular e a massa dos órgãos acessórios não demonstraram alterações significativas.

A redução do comprimento e diâmetro dos túbulos seminíferos está relacionada à redução na produção de testosterona (Mali et al., 2002) e conseqüentemente à infertilidade (Gupta et al., 2001). No entanto, não foram observadas diferenças significativas quanto à altura do epitélio seminífero e comprimento tubular entre os tratamentos. Dessa forma, não é possível afirmar que ocorreram alterações na produção de testosterona e sua conseqüente interferência no processo espermatogênico, sendo necessários testes de dosagem hormonal para confirmação de tais efeitos. Além disso, não houve alteração significativa no número de células de Leydig por testículo ou por grama de testículo, à semelhança do que foi descrito por Chieriggio (2005), para animais tratados com *H. aphrodisiaca* e *A. arvense*.

5. Conclusões

- Os tratamentos com extrato de *T. catigua*, nas concentrações de 36 e 72 mg e da solução de Catuama[®], na concentração de 0,7 ml/kg, aparentemente não influenciaram na organização testicular e no processo espermatogênico de ratos albinos Wistar.
- A administração dos extratos de *T. catigua*, nas concentrações de 36 e 72 mg e da solução de Catuama[®], na concentração de 0,7 ml/kg, não provocou efeitos na biometria corporal assim como na organização do parênquima testicular.
- Não houve alteração significativa no peso do parênquima testicular e nas proporções volumétricas do túbulo seminífero e espaço intersticial nos animais tratados.
- Foi observada diminuição na proporção das células de Leydig no intertúbulo, bem como no diâmetro nuclear, no volume celular e no volume por testículo e por grama de testículo dessas células.

6. Referências Bibliográficas

ADAIKAN, P.G., GAUTHAMAN, K., PRASAD, R.N., NG, S.C. Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* extract on the rabbit corpus cavernosum. **Annual Academy of Medicine**, Singapore, v. 29, n.1, p. 22-26, 2000.

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

ANTUNES, E., GORDO, W.M., DE OLIVEIRA, J.F., TEIXEIRA, C.E., HYSLOP, S., DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama[®] and its constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 416-421, 2001.

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**, v. 143, n. 1, p.15-19, 1999.

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

BASCOM, K.F., OSTRUD, H.L. Quantitative studies of testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. **Anatomy Records**, v. 31, p. 159-169, 1925.

BAUMBUSCH, F., PAPP, G.K., KPA, Z.S. Treatment for potency problems with Afrodor 2000. **Acta Chirurgica Hungara**, v. 35, n. 1-2, p. 87-92, 1995.

BELTRAME, F.L., RODRIGUES-FILHO, E., BARROS, F.A.P., CORTEZ, D.A.G., Cass, Q.B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as catuaba. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1-2, p. 257-263, 2006.

BENENCIA, F., COLOUMBIÉ, F.C. Immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* leaf aqueous extracts. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 167-171, 1998.

BURGOS RS, CABALLERO EE, SÁNCHEZ NS, SCHROEDER RA, WIKMAN GK, HANCKE JL. Testicular toxicity assessment of *Andrographis paniculata* dried extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 219-224, 1997.

CABRINI, D.A., CALIXTO, J.B. Herbal Catuama induces endothelium dependent and-independent vasorelaxation action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 32-38, 1997.

CAMPOS, M.M., FERNANDES, E.S., FERREIRA, J., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Antidepressant like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 45-53, 2005.

CASTELLANI, D.C. **Crêterios para o Manejo Sustentado de Plantas Medicinais em Ecossistemas da Mata Atlântica**. 2002. xxxf. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

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

CHIEREGATTO, L.C., **Efeito do tratamento cr nico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. e *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos**. 2005. 67f. Tese (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

CHRISTENSEN, A.K. A history of studies on testicular Leydig cells: the first century. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Org.), **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996, cap. 1, p. 1-30.

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

COOKE, B.A. Transduction of the luteinizing hormone signal within the Leydig cell. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Org.), **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996, cap. 16. 352-363.

COOPER, A.J., SMITH, C.G., ISMAIL, A.A., LORAINE, J. A. A controlled trial of Potensan Forte ("aphrodisiac" and testosterone combined) in impotence. **Journal of Medical Science**, v. 142, n. 4, p.155-161, 1973.

CORRÊA, A.D., BATISTA, R.S., QUINTAS, L.E.M. Plantas Mediciniais. Do cultivo à Terapêutica. 3ª Ed., Petrópolis: Vozes, RJ, 2000. 247 p.

DADUONE, J.P., DEMUOLIN, A. Structure and functions of the testis. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M., HUNTER, R.H.F. (Org.). **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993, cap.13, p. 227-250.

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

DYM, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. **Endocrinology Review**, v. 15, p.102-115, 1994.

ESKELAND, B.; THOM, E.; SVENDSEN, K.O. Sexual desire in men: effects of oral ingestion of a product derived from fertilized eggs. **Journal of International Medicine Research**., v. 25, n. 2, p. 62-70, 1997.

EWING, L.L., ZIRKIN, B.R., COCHRAN, R.C., KROMANN, N., PETERS, C., RUIZ-BRAVO, N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. **Endocrinology**, v. 105, n. 5, p.1135-1142, 1979.

FABRICANT, D.S., FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**., v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FAWCET, 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**, v. 9, p. 500-532, 1973.

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

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. 1991. 180f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.

FRANÇA, L.R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F. AND REGADERA, J. (Org.). **Male reproduction - a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications, 1998, cap. 16, p.197-219.

GHOSH, D., JANA, D., DEBNATH, J.M. Effects of leaf extract of *Stephania hernandifolia* on testicular gametogenesis and androgenesis in albino rats: a dose dependent response study. **Contraception**, v. 65, p. 379-384, 2002.

GODINHO, C.L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros**. 1999. 74f. Tese (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

GODINHO, H.P., CARDOSO, F.M. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. **Arquivos da Escola de Veterinária, UFMG**, v. 31, p. 351-361, 1979.

GONZALEZ, G.F.; CÓRDOVA, A.; VEJA, K.; CHUNG, A.; VILLENA, A.; GÓÑEZ, G.; CASTILLO, S. Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. **Andrologia**, v. 34, p. 367-372, 2002.

GRÜNWARD, J. The European phytotherapeutics market: figures, trends, analysis. **Drugs made in Germany**, v. 39, n. 1, p. 6-11, 1996.

GUPTA, R.S., KUMAR, P., DIXIT, V.P., DOHBAL, M.P. Antifertility studies of the root extract of the *Barleria prionitis* Linn in male albino rats with special reference to testicular cell population dynamics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 111-117, 2000.

GUPTA, R.S., YADAV, R.K., DIXIT, V.P., DOHBAL, M.P. Antifertility studies of *Colebrookia oppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. **Fitoterapia**, v. 72, p. 236-245, 2001.

GUPTA, R.S., SHARMA, R., SHARMA, A., BHATNAGER, A.K., DOBHAL, M.P., JOSHI, Y.C., SHARMA, M.C. Effect of *Alstonia scholaris* bark extract on testicular function of Wistar rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, n. 3, p. 175-178, 2002.

HALES, D.B. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Org.), **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996, Cap 21, p. 452-463.

HALES, D.B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 3-18, 2002.

ICHIHARA, I., KAWAMURA, H., PELLINIEMI, L.J. Ultrastructure and morphometry of the testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. **Cell and Tissue Research**, v. 271, p. 241-255, 1993.

ICHIHARA, I., KAWAMURA, H., NAKANO, T., PELLINIEMI, L.J. Ultrastructural, morphometric, and hormonal analysis of the effects of testosterone treatment on Leydig cells and other interstitial cells in young rats. **Annals of Anatomy**, v. 183, p. 413-426, 2001.

ISLAM, M.W., TARIQ, M., AGEEL, A.M., AL-SAID, M.S., AL-YHYA, A.M. Effect of *Salvia haematodes* on sexual behavior of male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n.1-2, p. 67-72, 1991.

JÉGOU, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. **International Reviews in Cytology**, v. 147, p. 25-95, 1993.

JOHNSON, L., NEAVES, W.B. Age-Related Changes in the Leydig Cell Population, Seminiferous Tubules, and Sperm Production in Stallions. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 703-712, 1981.

KLONER, R.A. Viagra: what every physician should know. **Ear Nose Throat Journal**, v. 77, n. 9, p. 783-786, 1998.

KUNZFELD, M. Trials with "Pasuma" of the Cascan Company, Wiesbaden. Preliminary report. **Zeitschrift für Haut- und Geschlechtskrankheiten**, v. 41, n. 4, p. 156-157, 1966.

LOHIYA, N.K., MISHRA, P.K., PATHAK, N., MANIVANNAN, B., BHANDE, S.S., PANNEERDOSS, S., SRIRAM, S. Efficacy trial on the purified compounds of the seeds of *Carica papaya* for male contraception in albino rat. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 135-148, 2005.

MALI, P.C., ANSARI, A.S., Chaturvedi, M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 61-67, 2002.

MALINI, T., MANIMARAN, R.R., ARUNAKARAN, J., ARULDHAS, M.M., Govindarajulu, P. Effects of piperine on testis of albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 219-225, 1999.

MANOSROI, A., SANPHET, K., SAOWAKON, S., ARITAJAT, S., MANOSROI, J. Effects of *Butea superba* on reproductive systems of rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 435-438, 2006.

MANTOVANI, A., MARANGHI, F. Risk assessment of chemical potentially affecting male fertility. **Contraception**, v. 72, p. 308-313, 2005.

MARQUES, L.C. Nova legislação para os fitoterápicos. In: BONFIM, J.R.A. & MERCUCCHI, V.L. (Org.). **A construção da política de medicamentos**, São Paulo: HUCITEC, 1997, p. 203-209.

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995. 220p.

MILLER, W.W. Jr. Afrodex in the treatment of male impotence: a double-blind cross-over study. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 10, n. 7, p. 354-359, 1968.

MING, L.C., CORRÊA JÚNIOR, C. Caracterização dos ambientes de ocorrência de catuaba em Santa Catarina. In: Resumos do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Recife, 2002. p. 74.

MUÑOZ, E. M., FOGAL, T., DOMINGUEZ, S., SCARDAPANE, L., GUZMAN, J., CAVICCHIA, J.C., PIEZZI, R. S. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). **Anatomical Records**, v. 252, p. 8-16, 1998.

NASEEM, M.Z., PATIL, S.R., PATIL, S.R., RAVINDRA, PATIL, R.S. Antispermatic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 9-16, 1998.

NORES, M.M., COURRÉGES, M.C.; BENENCIA, F., COULOMBIÉ, F.C. Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 99-106, 1997.

OKWUN, O.E., IGBOELI, G., FORD, J.J., LUNSTRA, D.D., JOHNSON, L. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three different breeds of boars. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 301-309, 1996.

PAULA, T.A.R. **Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. 1999. 84f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

PELLINIEMI, L.J., KUOPIO, T., FRÖJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Org.), **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996, cap. 5, p. 143-157.

PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. D. & TAYLOR, D. A.H. Meliaceae. **Flora Neotropica Monography**, v. 28, p.235-244, 1981.

PESCOVITZ, O.H., SRIVASTAVA, C.H., BREYER, P.R., MONTS, B.A. Paracrine control of spermatogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 5, p. 126-131, 1994.

PIRANI, J.R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Meliaceae. **Boletim de Botanica**, v. 13, p. 219-233, 1992.

PITMAN, V. **Fitoterapia**: As plantas medicinais e a saúde. Lisboa: Estampa, 1996. 188p.

POCCIA, D., Molecules of the somatic cells. In: POCCIA, D. **Molecular biology intelligence unit; molecular aspects of spermatogenesis**. Austin: R.G.Landes Company, 1994, cap. 4, p.75-90.

ROOSEN-RUNGE, E.C. **The process of spermatogenesis in animals.** Cambridge: Academic Press, 1977, 123p.

ROSS, M.H., KAYE, G.I., PAWLINA, W. **Histology:** A text and atlas. 4 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 21, 682-724, 2003.

RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., (Org.). **Histological and histopathological evaluation of the testis.** Clearwater: Cache River Press, 1990, cap. 1, p. 1-40.

RUSSELL, L.D., GRISWOLD, MD. **The Sertoli Cell.** Clearwater: Cache River Press, 1993, 801p.

RUSSELL, L. D., CHANDRASHEKAR, V., BARTKE, A., SINHA-HIKIM, A. P. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. **International Journal of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 93-106, 1994.

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

SCHLATT, S., MEINHARDT, A., NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **European Journal of Endocrinology**, v. 137, p. 107-117, 1997.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (ORG.) **Reproduction in Domestic Animals.** San Diego: Academic Press, Inc., 1991, cap. 6, p. 221-250.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL. E, NEILL, J.D. (Org.). **The physiology of reproduction**, New York: Raven Press, 1994., cap. 22, p.1363-1434.

SINHA-HIKIM, A. P., SINHA-HIKIM, I. S., AMADOR, A.G., BARTKE, A., WOOLF, A., RUSSELL, L. D. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. **American Journal of Anatomy**, v. 192, n. 2, p. 194-213, 1991.

SKINNER, M. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrinology Review**, v. 12, p. 45-77, 1991.

SOBOTKA, J.J. An evaluation of Afrodex in the management of male impotency: a double-blind crossover study. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 11, n. 2, p. 87-94, 1969.

SOUZA, L.A., MOSCHETA, I.S., MOURÃO, K.S.M., SILVÉRIO A. Morphology and Anatomy of the Flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 4, p. 3863-394, 2001.

SPITERI-GRECH, J., NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 1-14, 1993.

SRIVASTAVA, S.R., KESARWANI, S., KESHRI, G., SINGH, M.M. Evaluation of contraceptive activity of a mineralo-herbal preparation in Sprague-Dawley rats. **Contraception**, v. 72, p. 454-458, 2005.

SUBRAMONIAM, A., MADHAVACHANDRAN, V., RAJASEKHARAN, S., PUSHPANGADAN, P. Aphrodisiac property of *Trichopus zeylanicus* extract in male mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 21-27, 1997.

SYLVESTER, S.R. Leydig cell-Sertoli cell interaction. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Org.), **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996, cap. 22, p. 468-475.

SWEARINGEN S.G., KLAUSNER J.D. Sildenafil use, sexual risk behavior, and risk for sexually transmitted diseases, including HIV infection. **American Journal of Medicine**, v. 118, n. 6, p. 571-577, 2005.

TAE, H.J., JANG, B.G., AHN, D.C., CHOI, E.Y., KANG, H.S., KIM, N.S., LEE, J.H., PARK, S.Y., YANG, H.H., KIM, I.S. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowii*) during the breeding and non-breeding seasons. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 629-643, 2005.

TAHA, S.A., AGEEL, A.M., ISLAM, M.W., GINAWI, O.T. Effect of (-)-cathinone, a psychoactive alkaloid from khat (*Catha edulis* Forsk.) and

caffeine on sexual behaviour in rats. **Pharmacological Research**, v. 31, n. 5, p. 299-303, 1995.

TRENTINI, A.M.M. A auto-regulamentação na produção de fitoterápicos. In: BONFIM, J.R.A. & MERCUCCI, V.L. (Org.). **A construção da política de medicamentos**. São Paulo: HUCITEC, 1997, p. 213-215.

WING, T-Y., CHRISTENSEN, A.K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**, v. 165, p. 13-25, 1982.

ZHENG, B.L., HE, K., KIM, C.H., ROGERS, L., SHAO, Y., HUANG, Z.Y., LU, Y., YAN, S.J., QIEN, L.C., ZHENG, Q.Y. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. **Urology**, v. 55, n. 4, p. 598-602, 2000.

ZIRKIN, B. R., EWING, L. L., KROMANN, N., COCHRAN, R. C. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes in vitro: correlation with Leydig cells ultrastructure. **Endocrinology**, v. 107, p. 1867-1874, 1980.