

FERNANDA CAROLINA RIBEIRO DIAS

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA RAIZ DE *PFAFFIA GLOMERATA*  
(SPRENG.) PEDERSEN INTERFERE EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS E  
FERTILIDADE DE CAMUNDONGOS MACHOS 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  
2018

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

T

D541e  
2018

Dias, Fernanda Carolina Ribeiro, 1986-  
Extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*  
(Spreng.) Pedersen interfere em parâmetros reprodutivos e  
fertilidade de camundongos machos adultos / Fernanda Carolina  
Ribeiro Dias. – Viçosa, MG, 2018.  
xii, 140f : il. ; 29 cm.

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

1. Espermatozoides. 2. Fertilidade. 3. Estradiol. 4. Ginseng.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.


CDD 22. ed. 583.53

FERNANDA CAROLINA RIBEIRO DIAS

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA RAIZ DE *PFAFFIA GLOMERATA*  
(SPRENG.) PEDERSEN INTERFERE EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS  
E FERTILIDADE DE CAMUNDONGOS MACHOS 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: 23 de fevereiro de 2018.

  
Elizabeth Neves de Melo

  
Marcos de Lucca Moreira Gomes

  
Reggiani Vilela Gonçalves

  
José Humberto de Queiroz

  
Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

Dedico à

Meus familiares e amigos que  
me apoiaram e me impulsionaram, me dando forças  
para hoje estar aqui.

Ao meu Orientador e co-orientadoras  
por todos os ensinamentos e apoio ao longo desses 4 anos.

## AGRADECIMENTOS

Entendo que ser grato não é uma tarefa fácil, que no decorrer da vida, vamos perdendo a sensibilidade de ver tudo de bom que nos acontece. Tenho tentado ao longo desses anos de vida ser uma pessoa grata, pois entendo que a gratidão muda panoramas, amolece corações e muda destinos. Mas ser grato exige disciplina e perseverança para enxergar as coisas boas que nos acontecem, mesmo quando tudo mostra que não. Sei que não cheguei aqui sozinha, tenho consciência que precisei e precisarei de muitas pessoas, não quero nunca me tornar arrogante e achar que um dia poderei fazer algo só. Se este trabalho foi concluído, se foi um bom trabalho, o foi porque pude contar com muita gente, porque tive uma equipe por trás, e por isso talvez esses agradecimentos sejam um pouco longos.

Como não começar os agradecimentos Aquele que me sustenta, guia e direciona? Então a Ele o meu primeiro agradecimento sempre. A Deus! Pois sem Ele quem seria eu?

À minha família, tios, primos, mas especialmente aos meus avós, meu porto seguro, pessoas que me impulsionaram, que mesmo com o coração apertado pela partida, nunca me permitiram pensar em não seguir; mesmo sabendo que ambos sofreríamos com a distância, nunca transpareceram a vontade que eu sei que existia de me ver ficar; que mesmo quando meu coração sofreu, eles não me deixaram abandonar. Eles seguiram comigo, me mostrando que independente de pra onde a vida me levar, eu tenho família, tenho para onde voltar, tenho em quem confiar.

Minha Mãe Kátia, muito obrigada por ser essa mulher forte e decidida, de quem eu não ganhei só o nome, mas a força, a perseverança, ela que me ensinou que eu posso sim ir em frente, independente do que aconteça ao meu redor, que eu posso sim ser melhor a cada dia. Muito obrigada por todo o apoio, por todas as noites acordadas orando, enquanto eu viajava pelas noites entre Viçosa- Rio. Por se fazer presente mesmo com tantos quilômetros nos separando, por ter me incentivado a chegar até aqui, serei grata para sempre.

Ao meu Pai que hoje não está entre nós, mas que está em minha memória, e estaria orgulhoso dessa conquista. Ele que sempre disse que meu marido ia ter de andar na linha, pois se não andasse eu saberia fazer uma castração bem feita... Sei que no seu jeito firme era a forma de mostrar que se orgulhava das minhas conquistas e empenho. Nossa relação não foi a mais próxima, mas durante o doutorado aprendi a ver o outro lado da moeda, e pude antes de nossa última despedida, falar do meu amor e sentir o

seu. Ainda não tem sido fácil, mas dedico a você também essa conquista, ela também é sua.

Como não dedicar um agradecimento especial a Júnior e Ana Paula? Por todo o acolhimento durante esses anos, porque quando eu não suportava mais a distância, ou não aguentava mais estar aqui, eles abriam a casa, o coração e os ouvidos pra mim? E lógico ao amor da minha vida Daniel, por me tirar da rotina de trabalhos, análises, escrita e estudo, e me levar de volta a vida de brincadeiras, filmes e desenhos. Vocês sem dúvida foram essenciais para a finalização de mais esta etapa na minha vida.

À Roberta e Tiago pelo carinho e presença sem igual, por fazerem questão da minha presença sempre, por conseguirem me levar a um patamar diferente de vida. Por tentarem sempre me mostrar que posso falar não, que preciso cuidar de mim um pouco. Muito obrigada por sempre abrir a casa e o coração de vocês pra mim, sei que lá sempre terei um abraço, um ombro e um ouvido. Além de sempre salvar minha vida naquelas contas sem fim e fórmulas inexplicáveis. Sou grata a Deus pela vida de vocês.

Ao meu Orientador Sérgio da Matta pela confiança que me foi dada desde o dia em que vim conhecê-lo, por todos os ensinamentos, não só profissionais (que foram muitos), mas pessoais. Obrigada por me mostrar o “outro lado da moeda”, serei eternamente grata por tudo que me ensinaste. Engraçado como alguém pode conhecer você com tão pouco tempo de convivência, como pode notar a sutil diferença entre a angústia e a tristeza? Como pode notar que algo perturbar, mesmo sem eu dizer nada? Como pode confiar e acreditar em mim até mais do que eu? Muito obrigada por tudo, espero que estejamos sempre juntos, que ainda tenhamos muitos trabalhos e parcerias, pois tenho certeza que saí daqui com um amigo.

À Fabiana Melo, ela é tão parecida comigo que não sei nem como explicar. Ela que chegou e me conquistou, viramos amiga e depois foi promovida a coorientadora. Muito obrigada por me fazer parar, respirar. Obrigada por todas as vezes que eu pude desabafar com você mesmo às vezes sendo só paranoias da minha cabeça e por todas as vezes que precisei e você me ouviu, acolheu, apoiou, direcionou. Muito obrigada por sua amizade e carinho. Ainda temos muitos anos de amizade e trabalho pela frente. Conte comigo sempre, para qualquer coisa. Muito obrigada!

À Elizabeth Neves que me acompanha há tanto tempo, essa conhece minha aparência, minha essência e minhas entrelinhas, ela que me colocou nesse caminho, que me incentivou, me impulsionou. Lembro até hoje quando passei no Doutorado aqui ela me disse - um dia você vai sentar no meio fio e vai pensar chorando: o que eu fiz da minha vida, por que eu vim pra cá? Mas vai valer a pena no final. Hoje eu posso te

dizer, valeu muito a pena, valeu cada minuto, cada sorriso e cada lágrima. Muito obrigada por ser essa amiga tão presente em minha vida, nos bons e maus momentos. Obrigada por ver força em mim quando eu não tinha nenhuma.

À Marli Cupertino minha coorientadora, outra amiga que Viçosa me deu. Muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa, disponível. Obrigada por todo o apoio de sempre, principalmente na minha chegada, mostrando que eu poderia ser eu, que não importava o que falassem de mim, se eu fizesse meu trabalho sem passar por cima de ninguém, o que falam não importava. Obrigada por me ajudar nessa caminhada e aprendizados longe de casa. Conta sempre comigo, vamos trabalhar muito juntas ainda.

À Mariana Neves por tudo que ela me proporcionou aprender, me mostrou uma linha de pesquisa que nunca imaginei aprender ou trabalhar, me mostrou como é lindo o trabalho e como os seus ensinamentos enriqueceram meu trabalho e minha vida. Muito obrigada por tudo. E vamos em frente, ainda temos muito a viver juntas.

Ao professor Wagner e Kristhiano por me fornecerem as plantas necessárias para o experimento, além de todo o apoio nesse tempo, obrigada por confiar em mim ao fornecer suas plantas, sua criação. Cuidarei muito bem delas e vamos produzir muito com elas ainda. Muito obrigada.

Agradeço também a Marcos de Lucca que em pouco tempo de convivência conquistou minha admiração, que num primeiro contato me deixou em pânico quando sugeriu mudar tudo, mas me fez ver por outro ângulo, me tirou da zona de conforto e me colocou numa outra posição. Mostrou-me que nem sempre o jeito “tradicional” é o melhor jeito de explicar. Muito obrigada por toda a contribuição até agora oferecida e pelas parcerias estabelecidas. Vamos trabalhar...

Ao laboratório de Biologia Estrutural e todos que fazem parte dele, Matheus, Professora Izabel, Felipe, Luiz, Daniel, Talita, Grazi, Marcela, Ana Cláudia, Nara, Tatiana, Ana Luiza, Beth, Grasi, Viviane, Janaina, Amanda, Veronica, Lidiane, Eduardo. Muito obrigada pelo acolhimento, pelo apoio nos momentos de trabalho, pelos muitos sorrisos, momentos de distração, alegria. Vocês fizeram esses 4 anos, anos felizes. Vocês são demais.

Especialmente tenho de agradecer as meninas, Talita, Amanda, Veronica, Ana Luiza, Elizabeth, Janaina, Tatiana, Viviane, Susana por tudo que vocês sempre fizeram por mim, por todas as vezes que vocês correram para me ajudar em vésperas de viagens, trabalhos nos fins de semana, quando compraram minhas ideias e loucuras... e sempre rapidinho!!! Muito obrigada por tudo, foi sim tudo muito mais fácil, pois vocês estavam comigo. Sentirei muita saudade de conviver com vocês.

À Jerusa por toda a paciência e desprendimento ao ensinar e corrigir e recorrer, e ensinar, testar protocolos. Muito obrigada por sua ajuda sempre presente.

Preciso agradecer demais à República Aconchego: Glenda, Helen, Mayana, Emily, Pollyanna, Bianca e Amanda, muito obrigada por me receberem na casa de vocês, por todos os ensinamentos que levarei para a vida, por todo o cuidado quando estávamos doentes, pelos incentivos quando estava fazendo concurso, pelo apoio sempre presente nos momentos bons e ruins. Vocês são uma família, família sim, pois na família nem sempre são flores, houve desentendimentos! Houve momentos de conflito? Claro que sim convivência é assim, mas quando isso impediu de ajudar a outra? Quando isso impediu de levantar e apoiar durante um luto? Quando isso foi motivo para nos afastar? Convivência leva a ajustes e os ajustes levam a amizades duradouras. Muito obrigada pelo apoio de sempre, aprendi e cresci muito com vocês!! E vamos nós, viver muitas coisas lindas ainda, a primeira delas? Apresentar o nordeste a vocês junto com Mayana!!

Wellington, o famoso Well, ele merece todo o meu carinho e admiração, porque aguentar essa mulherada toda de TPM não é fácil, mas ele faz com louvor. Sempre tem um filme para tirar dos momentos de sufoco, companheiro fiel dos doces nas TPMs, aquele que incentiva a atividade física (embora eu quase nunca acompanhe). Muito obrigada por todos esses anos de amizade!! Espero um dia poder retribuir tudo que você fez e faz por mim.

Não posso deixar de agradecer a meus amigos de Recife, Gabriela, Olavio, Anderson, Tayse, Luiza, Veridiana que mesmo distantes se fizeram presentes, me apoiaram, ajudaram, ensinaram... foi pra eles que tantas vezes recorri e todas as vezes me seguraram e ensinaram. Muito obrigada pela amizade fiel todos esses anos.

Aos laboratórios de biodiversidade, Cultura de Tecidos, Ecologia de quirópteras, corantes naturais e compostos bioativos por disponibilizar sua estrutura e alunos para o desenvolvimento de técnicas necessárias para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Biologia Geral Adriana, Leandro, Gustavo e do programa de Pós Graduação Elizabeth, Michele e Leticia por sempre estarem disponíveis a ajudar, que não movem esforços e fazem até mais do que seu cargo exige. Vocês são muito importantes nesta caminhada e sou muito grata a vocês pela ajuda nesses anos.

Agradeço ao programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela confiança e oportunidade, a Universidade Federal de Viçosa por proporcionar a oportunidade de aprender tudo o que aprendi aqui.

À FAPEMIG pela bolsa fornecida

## **EPIGRAFE**

Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor,  
e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança.  
É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo.  
Colossenses 3:23-24

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
2.1. Objetivos Gerais.....	4
2.2. Objetivos Específicos .....	4
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	6
3.1. Plantas Afrodisíacas.....	6
3.2. <i>Pfaffia glomerata</i> .....	10
3.3. Testículo.....	12
3.4. Epidídimo.....	16
3.5. Espermatozoides e Fertilidade.....	17
3.6. Os corpos cavernosos e o mecanismo da ereção peniana .....	19
3.7. Estresse oxidativo.....	22
4. REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 1:.....	37
<b>Sperm DNA damage and embryonic losses caused by oxidative stress stimulated through the action of <i>Pfaffia glomerata</i> extract .....</b>	<b>37</b>
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS .....	41
Material Biológico.....	41
Extração.....	41
Animais .....	41
Desenho experimental.....	42
Acasalamento natural e análise de fertilidade.....	42
Coleta dos órgãos masculinos após período de acasalamento.....	43
Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário.....	43
Avaliação espermática .....	44
Motilidade.....	44
Morfologia espermática.....	44
Integridade estrutural das membranas espermáticas .....	45
Coleta de epidídimos após o tratamento com BGE.....	45

Marcadores de estresse oxidativo .....	45
Viabilidade dos espermatozoides no epidídimo.....	46
Análises estatísticas.....	46
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
BGE alterou índices de fertilidade .....	47
BGE reduziu o número de espermátides e produção espermática diária no testículo, bem como o número de espermatozoides.....	48
Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aumentou em animais tratados com BGE alterando a atividade das enzimas CAT e GST.....	48
Viabilidade dos espermatozoides no epidídimo.....	49
Análise estatística do componente principal.....	49
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 2: .....</b>	<b>73</b>
Hydroalcoholic extract of the root of <i>Pfaffia glomerata</i> alters the organization of the seminiferous tubules modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice's testes.....	73
ABSTRACT .....	74
INTRODUÇÃO.....	75
RESULTADO E DISCUSSÃO .....	76
SECÇÃO EXPERIMENTAL .....	83
Procedimentos experimentais gerais.....	83
Material vegetal.....	83
Extração e Prospecção Fitoquímica.....	84
Perfil cromatográfico dos extratos e quantificação do composto principal em HPLC ...	84
Animais experimentais .....	85
Coleta do material e microscopia de luz .....	85
Biometria corporal e testicular.....	86
Morfometria.....	86
Contagem de célula germinativa.....	87
Histopatologia.....	88
Viabilidade de Célula Germinativa .....	88
Estresse oxidativo.....	89
Estatística.....	90
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO 3: .....</b>	<b>106</b>
Ação estimulante do Ginseng brasileiro nos corpos cavernosos e tecido intertubular testicular e efeitos colaterais nas células de Leydig, e na concentração de testosterona sérica de camundongos adultos .....	106

<b>ABSTRACT</b> .....	107
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	108
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	109
<b>Material vegetal</b> .....	109
<b>Animais experimentais</b> .....	109
<b>Coleta de materiais e microscopia de luz</b> .....	110
<b>Biometria corporal e testicular</b> .....	110
<b>Morfometria</b> .....	111
<i>Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo</i> .....	111
<i>Dímetro nuclear, volumes nuclear e citoplasmático, número de células de Leydig por testículo, por grama de testículo, relação nucleoplasmática da célula de Leydig e Índice Leydigossomático</i> .....	111
<b>Viabilidade de célula</b> .....	112
<b>Testosterona sérica e 17<math>\beta</math>-estradiol</b> .....	112
<b>Morfometria dos corpos cavernosos</b> .....	113
<b>Quantificação de colágeno e músculo liso</b> .....	113
<b>Óxido nítrico</b> .....	113
<b>Análises Estatísticas</b> .....	114
<b>RESULTADOS</b> .....	114
<b>Dados Biométricos</b> .....	114
<b>Morfometria</b> .....	114
<b>Histopatologia</b> .....	115
<b>Germ Cell Availability</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Testosterona e 17<math>\beta</math>-Estradiol</b> .....	116
<b>Morfometria do pênis</b> .....	116
<b>Quantificação de colágeno e músculo liso</b> .....	116
<b>Óxido Nítrico</b> .....	116
<b>Agrupamento</b> .....	116
<b>DISCUSSÃO</b> .....	116
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	122
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	142

## RESUMO

DIAS, Fernanda Carolina Ribeiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen interfere em parâmetros reprodutivos e fertilidade de camundongos machos adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadoras: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo e Marli do Carmo Cupertino.

As folhas e raízes de *Pfaffia glomerata* são usadas como afrodisíacos, tranquilizantes e antirreumáticos. Devido à ausência de dados científicos experimentais faz-se necessário estudos que identifiquem suas propriedades medicinais. Baseado nisso objetivou-se avaliar o efeito de extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* (BGE) sobre o parênquima testicular, espermáticos e fertilidade. Camundongos adultos (n=60) foram divididos em controle (água), Citrato de sildenafil (7mg/kg) e 3 grupos recebendo doses diárias (100, 200 e 400 BGE mg/Kg) e uma dose intermitente (200 BGE mg/Kg a cada três dias) por 42 dias. Após a ingestão do extrato, houve redução na proporção de túbulo e epitélio seminíferos, aumento do volume de túnica própria e redução do número de células de Sertoli, sem prejuízo a produção espermática. Entretanto, o BGE promoveu morte celular e alteração na frequência de estágio dos túbulos, além do aumento de óxido nítrico. Verificou-se também aumento do percentual e volume de vasos sanguíneos e espaço linfático, redução da testosterona, aumento do estradiol e morte de células de Leydig. Observou-se aumento de corpos cavernosos, aumento de colágeno, redução do músculo liso e aumento do óxido nítrico peniano. O tratamento causou ainda redução no número e viabilidade de espermatozoides, estes apresentavam altos índices de patologias, como espaços vacuolares, degeneração e descamação. Baixo percentual de espermatozoides com membrana íntegra e alterações na motilidade, leva ainda a perdas embrionárias. O princípio de ação do extrato baseia-se na produção de NO, atuando sobre os vasos sanguíneos aumentando os corpos cavernosos. O tratamento leva ainda redução do músculo liso peniano, danos nas células de Leydig, acúmulo de gotículas de lipídios no seu citoplasma levando, inclusive, à morte da célula de Leydig e o aumento do NO. O extrato atua também aumentando ROS, culminando com danos de DNA, que leva a perdas embrionárias. Porém embora o quadro leve a aparente redução da atividade sexual, o aumento de estradiol e colágeno é uma forma de compensação e assim da manutenção da atividade sexual. Assim, o ginseng brasileiro tem ação afrodisíaca, porém com efeitos colaterais na produção de testosterona e na viabilidade das células germinativas.

## ABSTRACT

DIAS, Fernanda Carolina Ribeiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Hydroalcoholic extract of the root of *Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen interferes in reproductive parameters and fertility of adult male mice.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Advisers: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo and Marli do Carmo Cupertino.

The leaves and roots of *Pfaffia glomerata* are used as aphrodisiacs, tranquillizers and antirheumatics. Due to the lack of experimental scientific data, studies are necessary to identify its medicinal properties. Based on this the objective was to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of the *P. glomerata* root (BGE) on the testicular parenchyma, spermatozoa and fertility. Adult mice ( $n = 60$ ) were divided into control (water), sildenafil Citrate (7mg / kg) and 3 groups receiving daily doses (100, 200 and 400 BGE mg / kg) and an intermittent dose (200 BGE mg / kg every three days) for 42 days. After ingestion of the extract, there was a reduction in the proportion of seminiferous tubule and epithelium, increase of the own tunica volume and reduction of the number of Sertoli cells, without prejudice to sperm production. However, BGE promoted cell death and a change in tubule stage frequency, in addition to an increase in nitric oxide. There was also an increase in the percentage and volume of blood vessels and lymphatic space, reduction of testosterone, increase of estradiol and death of Leydig cells. There was an increase of cavernous bodies, increase of collagen, reduction of smooth muscle and increase of penile nitric oxide. The treatment also caused a reduction in the number and viability of spermatozoa, which presented high rates of pathologies, such as vacuolar spaces, degeneration and desquamation. Low percentage of spermatozoa with whole membrane and alterations in the motility, still leads to embryonic losses. The principle of action of the extract is based on the production of NO, acting on the blood vessels increasing the cavernous bodies. The treatment also leads to reduction of the penis smooth muscle, Leydig cell damage, accumulation of lipid droplets in its cytoplasm leading to Leydig cell death and increased NO. The extract also works by increasing ROS, culminating with DNA damage, leading to embryonic losses. However, although the picture leads to the apparent reduction of sexual activity, the increase of estradiol and collagen is a form of compensation and thus the maintenance of sexual activity. Thus, Brazilian ginseng has an aphrodisiac effect, but with side effects on testosterone production and germ cell viability.

## 1. INTRODUÇÃO

Na década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que mais da metade dos países em desenvolvimento apresentavam o uso das plantas medicinais como única forma de acesso à saúde (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). Entretanto, elas são consideradas medicinais quando apresentam substâncias de ação farmacológica que atuem, direta ou indiretamente, como medicamento. Porém, para ter esse reconhecimento é necessário que sua autenticidade, integridade e pureza sejam comprovadas (MACHADO, 2009). O uso correto para fins terapêuticos, requer a utilização de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêutica, baseadas na tradição popular ou cientificamente validadas como medicinais (LORENZI & MATOS, 2002).

Muitas plantas brasileiras têm apresentado potencial farmacológico promissor relacionado a funções reprodutivas, atuando positivamente no tecido testicular e em células espermáticas (FAROMBI *et al.*, 2013). Particularmente a *Pfaffia glomerata*, popularmente conhecida como fáfia ou ginseng brasileiro, tem importância ornamental, alimentar e medicinal (NICOLOSO *et al.*, 2001; SILVA JÚNIOR & OSAIDA, 2005; SILVA *et al.*, 2010). O interesse comercial nesta planta deve-se principalmente à qualidade fitoquímica de suas raízes tuberosas (NICOLOSO *et al.*, 1999), bastante utilizadas na medicina popular como afrodisíaco (LORENZI & MATOS, 2002). Suas propriedades medicinais foram comprovadas como: antidepressivas (DE-PARIS *et al.*, 2000) e antineoplásicas (SILVA, 2008), além de auxiliar no tratamento de distúrbios gastrointestinais (Freitas *et al.*, 2004), com função protetora da mucosa gástrica (OTOFUGI, 2005), anti-inflamatório e analgésico (NETO *et al.*, 2005; QUEIROGA *et al.*, 2008), cicatrizante de feridas da pele (GUERREIRO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010) tônico e afrodisíaco, e também para o tratamento de diabetes e reumatismo (MAGALHÃES, 2002).

Suas propriedades medicinais são atribuídas à presença do fitoecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E), também conhecido como  $\beta$ -ecdisona (FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2008), sendo este composto utilizado como marcador químico no controle de qualidade da matéria-prima e dos medicamentos produzidos com *P. glomerata* (MAGALHÃES, 2000; ZIMMER *et al.*, 2006). No entanto existem poucos estudos que mostrem os efeitos da *P. glomerata* sobre o sistema reprodutor masculino e fertilidade. Sabe-se que camundongos machos tratados com o extrato dessa planta nas concentrações de 300 e 400mg/Kg apresentaram aumento nas concentrações de

testosterona e aumento de percentual de corpos cavernosos, além de redução na produção espermática diária (MATTA, 2012). Porém, fêmeas de camungongo tratadas com *P. glomerata* mostraram que o extrato não afetou a implantação embrionária quando administradas no período de implantação (4<sup>o</sup>- 6<sup>o</sup> dias de gestação) e pós implantação (7<sup>o</sup>- 9<sup>o</sup> dias de gestação), mas houve um aumento na mortalidade embrionária e fetal, com ocorrência de malformações quando o extrato da planta foi administrado no período pré-implantação (1<sup>o</sup> - 3<sup>o</sup> dias de gestação) (BARILLI e MONTANARI, 2008).

Modificações nos ambientes onde ocorrem a produção e maturação espermática podem levar ao comprometimento da fertilidade, por interferir na qualidade dos espermatozoides (VERNET *et al.*, 2004). De fato, danos ao espermatozoide podem trazer impacto ao desenvolvimento embrionário e ao bem-estar da prole (WAI-SUN *et al.*, 2006). As alterações espermáticas causam falhas de fertilização (VERNET *et al.*, 2004), evidenciando o efeito paterno no desenvolvimento embrionário (WAI-SUN *et al.*, 2006). Falhas na fertilização estão associadas a baixa qualidade do espermatozoide e danos do seu DNA (CHEN *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2015). Uma vez que espermatozoides com DNA danificado são capazes de fertilizar ovócitos (O *et al.*, 1988), causando maior incidência de anormalidades estruturais em embriões implantados (YING *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001).

Orientações regulamentares mais rigorosas discorrem sobre a necessidade da realização de avaliações sensíveis e cuidadosas do trato reprodutivo masculino para potenciais efeitos tóxicos dos compostos administrados, mesmo os de origem vegetal, que podem levar à alterações da taxa de fertilidade masculina (CREASY, 2003). Um dos principais mecanismos pelos quais plantas e outros tóxicos podem desencadear lesões tissulares é através da desregulação do equilíbrio redox, levando a um quadro chamado estresse oxidativo. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou nitrogênio (ERNS) e as defesas antioxidantes celulares. Quando em baixas concentrações, as EROS funcionam como mediadores de ajustes celulares, sendo consideradas mensageiros secundários. Porém, quando estão em concentrações elevadas provocam injúrias celulares por meio de oxidação de proteínas, lipídios e DNA, causando degeneração que podem evoluir para a morte celular por necrose ou apoptose (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de extratos de *P. glomerata* administrados a camundongos a fim de verificar seus efeitos na

espermatogênese, no número e qualidade de espermatozoides e características penianas, além das consequências na fertilidade e condições oxidativas. Nossa hipótese estipula que a planta é afrodisíaca, porém causa danos à espermatogênese sem comprometer a fertilidade. Para isso, o trabalho avaliou parâmetros espermáticos (motilidade, morfologia, integridade e número de espermatozoides), parâmetros testiculares (produção espermática diária, contagem de células, produção de testosterona e estradiol), fertilidade (perdas pré e pós implantação, índices de fertilidade e acasalamento) e estado oxidativo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

O presente estudo pretendeu avaliar os efeitos de doses crescentes e uma dose descontínua do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* em camundongos Swiss adultos, sobre a porção androgênica e gametogênica testicular, nos corpos cavernosos do pênis, nos espermatozoides e na fertilidade. Essa avaliação foi feita através de investigação de mudanças morfológicas, histométricas e hormonal.

### **2.2. Objetivos Específicos**

#### **2.2.1. Fitoquímica**

- ✓ Realizar a prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*,
- ✓ Identificação e quantificação do composto majoritário;
- ✓ AAtividade antioxidante do extrato

#### **2.2.2. Testículo**

- ✓ 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 e da célula de Sertoli;
- ✓ 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;
- ✓ Realizar avaliação histopatológica;
- ✓ Quantificação de células mortas;
- ✓ Avaliar os danos oxidativos causados pelo tratamento com a *P. glomerata*.

#### **2.2.2. Epidídimo**

- ✓ Avaliar morte celular/autofagia;
- ✓ Avaliar os danos oxidativos causados pelo tratamento com a *P. glomerata*;
- ✓ Avaliar parâmetros espermáticos, como morfologia, motilidade e cinética espermáticas, além da integridade estrutural das membranas, plasmática e acrossomal.

### **2.2.3. Fertilidade**

Comparar a fertilidade de fêmeas híidas cruzadas com machos expostos ao tratamento com a *P. glomerata*, a partir de resultados obtidos para:

- ✓ Cálculo de taxa de acasalamento;
- ✓ Cálculo de taxa de prenhez;
- ✓ Observar variações do peso de ovário;
- ✓ Quantificar o número de corpos lúteos, número de implantações, número de fetos, peso de fetos, potencial de fertilidade;
- ✓ Comparar as taxa de perdas pré e pós implantação.

### **2.2.4. Pênis**

- ✓ Analisar morfológica e morfometricamente os corpos cavernosos;
- ✓ Dosar de óxido nítrico;
- ✓ Quantificar de colágeno I e III;
- ✓ Quantificar de Músculo liso.

### **2.2.5. Sangue**

- ✓ Medir variações na concentração plasmática de testosterona;
- ✓ Medir variações na concentração plasmática de 17  $\beta$ -estradiol.

### **2.2.6. Status Oxidativo (Testículo e epidídimo)**

- ✓ Determinar a atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST);
- ✓ Determinar de malondialdeído;
- ✓ Mensurar atividade do óxido nítrico (NO).
- ✓ Mensurar produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1. Plantas Afrodisíacas**

Segundo levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS) boa parcela da população mundial depende de medicamentos de origem vegetal para os cuidados primários de saúde (ALOK *et al.*, 2013). Com o uso das plantas, observou-se que algumas delas melhoravam a função sexual popularizando seu uso para esse efeito, mesmo sem sua ação completamente conhecida. A busca por novos afrodisíacos, assim como o conhecimento do modo de ação, é uma preocupação global e tem levado cientistas de vários países a pesquisarem sobre o assunto (MELO, 2010). Desta forma muitas delas foram identificadas ou avaliadas quanto ao seu potencial afrodisíaco e tiveram propriedades afrodisíacas comprovadas, mas os mecanismos de ação nem sempre elucidados (Tabela 1). Elas demonstraram possuir agentes afrodisíacos atuando no aumento da libido e melhorando o desempenho sexual, comprovados através de ensaios experimentais (SINGH *et al.*, 2013).

Segundo Sandroni (2001), os afrodisíacos podem ser classificados, pelo seu modo de ação, em três tipos: aqueles que aumentam a libido, a potência e o prazer sexual. Essa definição foi ampliada para incluir as substâncias que melhoram o desempenho sexual ou ajudam no funcionamento dos órgãos sexuais femininos e masculinos (SHAMLOUL, 2010; MELNYK e MARCONE, 2011). Eles atuam sexualmente através das propriedades alucinógenas ou estimulantes do humor. Além disso, pode ocorrer por mudanças hormonais e na fisiologia do pênis atuando 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).

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

<b>Nome da planta</b>	<b>Família</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Extrato utilizado</b>	<b>Benefícios</b>	<b>Referência</b>
<i>Ruta chalepensis</i>	Rutaceae	Folha	Aquoso	Aumento de peso testicular; Aumento de testosterona; Aumento de contagem espermática.	QARAWI, 2005
<i>Fadogia agrestis</i>	Rubiaceae	Caule	Aquoso	Aumento de testosterona; Melhoria de desempenho sexual com aumento no número de montagem e frequência de intromissão.	YAKUBU <i>et al.</i> , 2005
<i>Kaempferia parviflora</i>	Zingiberaceae	Rizomas	Etanólico	Aumento do fluxo sanguíneo testicular	CHATURAPANICH <i>et al.</i> , 2008
<i>Blepharis edulis</i>	Acanthaceae	Semente	Etanólico	Aumento de testosterona; Melhoria de desempenho sexual, frequência de montagem, latência de intromissão.	PANDE; PATHAK, 2009
<i>Tribulus terrestris</i>	Zygophyllaceae	Fruto	--	Aumento de peso testicular; Melhoria de desempenho sexual com aumento de frequência de montagem;	SINGH;GUPTA, 2011

<i>Fadogia agrestis</i>	Rubiaceae	--	Aquoso	Aumento na frequência de montagem, de penetração e prolongamento da latência ejaculatória.	MALVIYA <i>et al.</i> , 2011
<i>Pfaffia glomerata</i>	Amaranthaceae	Raiz	Hidroalcoólico	Aumento de testosterona	MATTA, 2012
<i>Landolphia dulcis</i>	Apocynaceae	Raiz.	Etanólico	Aumento de testosterona, corpo cavernoso, redução na produção espermática	ILODIGWE <i>et al.</i> , 2013
<i>Monsonia angustifolia</i>	Geraniaceae	Parte aérea	Aquoso	Melhoria de desempenho sexual com aumento de frequência de montagem e frequência de intromissão;	FOUCHE <i>et al.</i> , 2015
<i>Tinanthus fasciculatus</i>	Bignoniaceae	Cipó	Alcoólico	Aumento de testosterona	DAMASCENO, 2017
				Aumento de testosterona, aumento da produção espermática e peroxidação lipídica	

---

<i>Zea mays</i>	Poáceas	--	Aquoso	Aumento da excitação e a execução do comportamento sexual, aumento da ejaculação	CARRO-JUÁREZ <i>et al.</i> , 2017
<i>Aloe barbadensis</i> Mill	Liliáceas	Raiz	Etanólico	Aumento da testosterona, aumento da frequência de monta,	ERHABOR E IDU, 2017

---

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 para grande parte da população que acredita que são seguras e livres de efeitos colaterais (DUMESTRE-TOULET *et al.*, 2002; VENHUIS *et al.*, 2008).

### **3.2. *Pfaffia glomerata***

O gênero *Pfaffia* pertence à família Amaranthaceae e abrange cerca de 90 espécies que encontram-se distribuídas em toda América do Sul, tropical e subtropical, desde as Guianas até Bolívia e Argentina. No Brasil, foram descritas 27 espécies (VIDAL *et al.*, 1967), ocorrendo principalmente no Paraná e Mato Grosso do Sul (TESKE e TRENTINI, 2001), além de São Paulo, 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). O gênero compreende espécies conhecidas popularmente como para-tudo, corango-açu, corango-de-batata ou ainda corango-sempré-viva, enquanto especificamente *Pfaffia glomerata*, *P. iresinoides* e *P. paniculata* são conhecidas como ginseng brasileiro. O termo “ginseng” é de origem chinesa e etimologicamente significa aspecto humanoide (Jin = homem e Chen = aspecto) (VIGO *et al.*, 2004) que pode ser notado nas suas raízes.

A espécie *Pfaffia glomerata* é a espécie de maior importância medicinal e comercial (FIGUEIREDO *et al.*, 2004; VIGO *et al.*, 2004; ZIMMER *et al.*, 2006), sendo suas propriedades medicinais comprovadas contra depressão (DE-PARIS *et al.*, 2000) e câncer (SILVA, 2008), além de auxiliar no tratamento de distúrbios gastrointestinais (FREITAS *et al.*, 2004) por promover proteção da mucosa gástrica (OTOFUGI, 2005), além de apresentar efeito anti-inflamatório e analgésico (NETO *et al.*, 2005; QUEIROGA *et al.*, 2008), atua no processo de cicatrização de feridas da pele (GUERREIRO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010). Atua como tônico e afrodisíaco, para o tratamento de diabetes e reumatismo (MAGALHÃES, 2002), além de reduzir o esgotamento físico e mental, a falta de memória e o estresse (RATES & GOSMANN, 2002). Extratos hidroalcoólicos da espécie mostram-se ativos contra alguns protozoários, como *Leishmania braziliensis* (NETO *et al.*, 2004). Outros trabalhos relataram efeitos negativos do extrato exibindo atividade depressora do sistema nervoso central e efeito amnésico (DEPARIS *et al.*, 2000) além de 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 evitando os danos oxidativos induzidos por  $\text{Fe}^{2+}$ /citrato. (CAMILLO e RODRIGUES, 2009).

Dentre os compostos químicos presentes nas raízes de *Pfaffia* destacam-se saponinas triterpênicas e fitoecdisteroides (SHIOBARA *et al.*, 1993). As propriedades medicinais da espécie são atribuídas à presença do fitoecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E), também conhecido como  $\beta$ -ecdisona (FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2008), sendo este composto utilizado como marcador químico no controle de qualidade da matéria-prima e dos medicamentos produzidos com *P. glomerata* (MAGALHÃES, 2000; ZIMMER *et al.*, 2006). A  $\beta$ -ecdisona apresenta 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  $\beta$ -ecdisona dá a espécie atividade adaptógena contra estresses físico e mental (VIGO *et al.*, 2003; KAMADA *et al.*, 2009). As raízes de *Pfaffia* apresentam cerca de 11% de saponinas, incluindo grupos químicos singulares denominados pfaffosídeos, assim como ácidos fáficos, glicosídeos e nortriterpenos. A ação destas saponinas foi comprovada na inibição de cultura de células de tumores do tipo melanoma e na regulação dos níveis de açúcares sanguíneos (ALVES *et al.*, 2006).

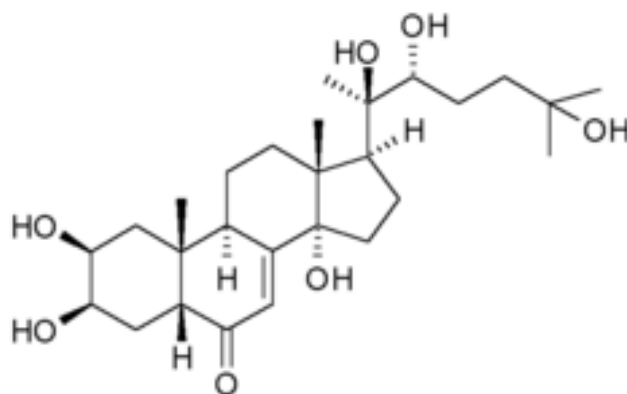


Figura 1: Molécula do 20-hidroxiecdisona

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). De fato a *P. glomerata* apresenta um potencial risco de entrar em extinção devido à coleta indiscriminada e pela diminuição das suas áreas de ocorrência natural (GUERREIRO *et al.*, 2009).

### 3.3. Testículo

Os testículos são órgãos com função exócrina e endócrina, responsáveis pela produção de espermatozoides e andrógenos, os quais mantêm a função reprodutiva e as características sexuais secundárias (RUSSELL e FRANÇA, 1995; HERMO *et al.*, 2010). 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 e o tubular, constituído por túbulos seminíferos (RUSSELL *et al.*, 1990).

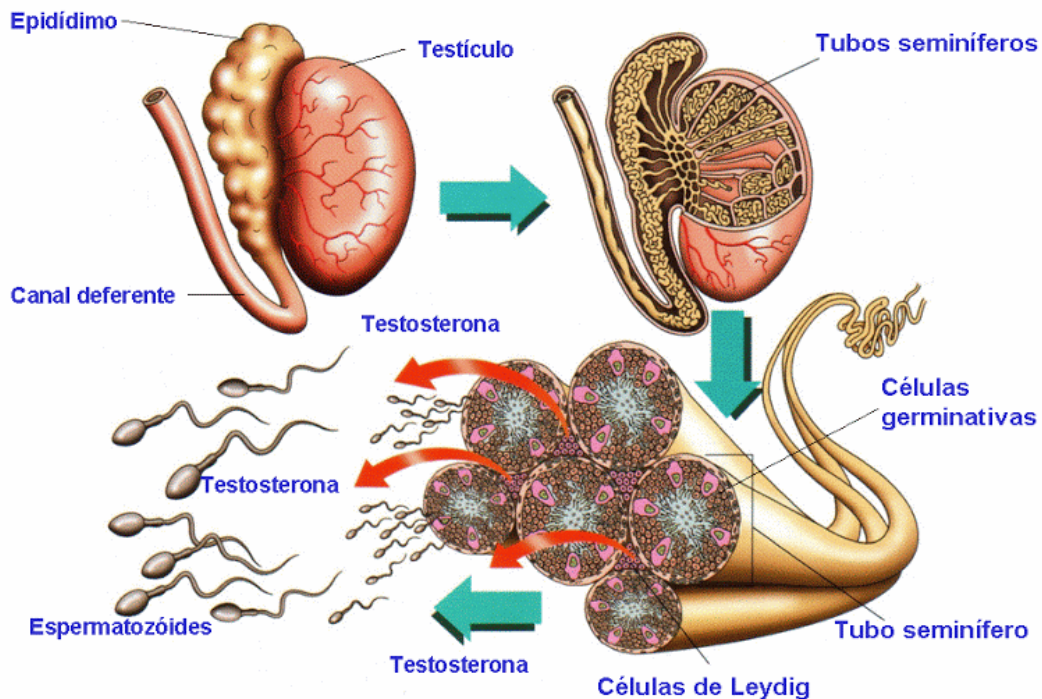


Figura 2: Evidenciando estrutura e composição testicular.

Os túbulos seminíferos são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular e o fluido secretado pelas células de Sertoli. O epitélio seminífero é formado por duas populações celulares distintas: as células germinativas e as células de Sertoli (célula somática) (KARL e CAPEL, 1998). O túbulo seminífero é envolvido por uma lâmina basal e uma bainha de tecido conjuntivo, constituindo a túnica própria, que contém em sua camada mais interna as células mioides (HERMO *et al.*, 2010). O intertúbulo é composto por vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, células do tecido conjuntivo como fibroblastos e macrófagos e células de Leydig. Os túbulos seminíferos são responsáveis pela função exócrina, ou seja, produção de espermatozoides, enquanto as células de Leydig secretam andrógeno testicular (NAVARRO *et al.*, 2004). Quaisquer alterações em um desses componentes podem estar correlacionadas com alterações na função testicular (SHARPE *et al.*, 1990).

O processo pelo qual as células germinativas se desenvolvem e se diferenciam em espermatozoides, sempre associado a células de Sertoli, é denominado espermatogênese. A espermatogênese pode ser dividida em três etapas principais: I- fase proliferativa, na qual há multiplicação de espermatogônias por mitose; II- fase meiótica, onde o material genético é recombinado e segregado; III- fase denominada de espermiogênese, na qual ocorre a citodiferenciação das espermátides arredondadas em espermatozoides (RUSSELL *et al.*, 1990; DE KRETZER *et al.*, 1998; HERMO *et al.*, 2010).

A espermatogênese é um processo complexo, mas altamente preciso e ocorre de forma ordenada, composta de processos cíclicos repetitivos, subdivididos em estádios (LEBLOND e CLERMONT, 1952; SHARPE *et al.*, 1990; PHILLIPS *et al.*, 2010). Os estádios são classificados por dois métodos: o da morfologia tubular, o qual toma como base a morfologia e a posição das células germinativas, sendo descritos oito estádios para a maioria das espécies (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; ROOSEN-RUNGE, 1955; BERNDTSON, 1977); e o método do sistema acrossômico, onde o número de estádios varia de acordo com a espécie (LEBLOND e CLEMONT, 1952). As células de Sertoli criam um ambiente altamente especializado onde é possível a ocorrência da espermatogênese (DE KRETZER *et al.*, 1998). As células de Sertoli e as células germinativas estão intimamente associadas no epitélio seminífero, constituindo um ambiente basal onde se encontram as espermatogônias e os espermátócitos primários em preleptóteno, e um ambiente adluminal onde são observados espermátócitos primários,

secundários e espermatídes em diferentes fases de diferenciação (RUSSELL *et al.*, 1990; MORAIS *et al.*, 2016).

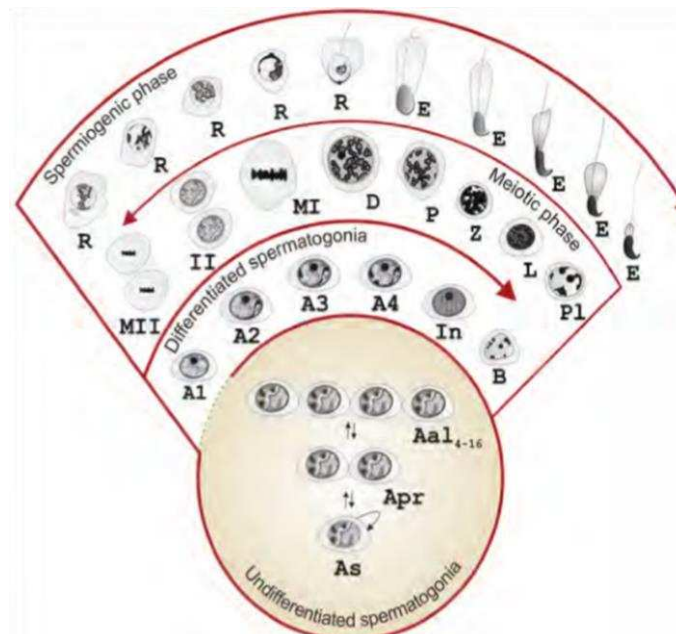


Figura 3: Espermatogênese (Lara *et al.*, 2018)

A espermatogênese é regulada pelo FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), que controlam as funções das células de Sertoli e das células de Leydig, respectivamente. O LH estimula a síntese de testosterona pelas células de Leydig, enquanto a síntese de ABP (proteína ligante de andrógeno) pelas células de Sertoli é estimulada pelo FSH. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), produzido no hipotálamo, estimula a secreção de LH e FSH. O FSH estimula as células de Sertoli a liberar um hormônio peptídico chamado inibina que, especificamente, inibe a secreção de FSH. A testosterona por sua vez atua na hipófise diminuindo a síntese de LH, ou até mesmo diminuindo a síntese de GnRH, através de feedback negativo (O'DONNELL *et al.*, 2001; KIERSZENBAUM, 2008; SALTZMAN *et al.*, 2010).

As células de Sertoli aparecem no início do desenvolvimento embrionário e se proliferam até as primeiras semanas depois do nascimento. Após a proliferação, as células de Sertoli se diferenciam e mantêm seu número estável ao longo da vida adulta (O'DONNELL *et al.*, 2001).

A célula de Sertoli estende-se desde a base até o lúmen dos túbulos seminíferos (OLIVEIRA e ALVES, 2015). O núcleo da célula de Sertoli é uma das suas organelas mais distinguíveis, pois é grande e capaz de mudar de forma através do ciclo do epitélio

seminífero, geralmente exibindo profundas invaginações no envoltório nuclear (FRANÇA *et al.*, 2016). O número total de células de Sertoli estabelece o limite da produção de espermatozoides pelo testículo e a eficiência espermatogênica está correlacionada com a capacidade de suporte das células de Sertoli (HESS e FRANÇA, 2005).

As funções de Sertoli são: formação da barreira de células de Sertoli (Hematotesticular); promoção de suporte estrutural e nutricional às células germinativas em desenvolvimento; fagocitose de corpos residuais e células germinativas degeneradas; produção e liberação de fatores regulatórios, produção de fluido testicular e espermição (OLIVEIRA e ALVES, 2015). Junções de oclusão entre as células de Sertoli formam a barreira testicular. Porém, junções entre células de Sertoli e células germinativas, bem como as junções entre as células mioides, contribuem para aumentar a eficiência da barreira. Essas junções são de adesão (como desmossomos) e junções do tipo GAP, que também contribuem para a função dessa barreira (FRANÇA *et al.*, 2016). A barreira das células de Sertoli é responsável pela separação do epitélio seminífero em dois ambientes: o basal e o adluminal. Esta barreira separa as células germinativas avançadas do suprimento de sangue, o que impede a passagem de leucócitos para dentro dos túbulos seminíferos. Permite também que as células de Sertoli controlem a passagem de moléculas através da barreira, criando um microambiente único e isolado do sistema imune para as células germinativas (FRANÇA *et al.*, 2016).

As células de Leydig aparecem no testículo no início do desenvolvimento embrionário, secretam altas concentrações de andrógeno requeridos para a masculinização fetal, e persistem durante toda vida adulta. As células de Leydig fetais não são progenitoras das células de Leydig no adulto. Antes da puberdade, há um rápido crescimento das células de Leydig precursoras mesenquimais, e assim, as células de Leydig dividem-se para produzir a população de células adultas, responsável pela produção de testosterona e manutenção da função reprodutiva masculina (LEJEUNE *et al.*, 1998; O'DONNELL *et al.*, 2001; NAVARRO *et al.*, 2004). Elas estão presentes no compartimento intertubular em proximidades a vasos sanguíneos e linfáticos. São produtoras de esteroides e, portanto, contêm gotículas lipídicas em seus citoplasmas. Essas células sintetizam a testosterona, hormônio essencial para a espermatogênese normal, fertilidade e também responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas secundárias (SHARPE *et al.*, 1990).

Sharpe e colaboradores (1990) reconheceram que as células de Leydig são fontes de vários outros hormônios, não se limitando somente à produção de testosterona, mas de outros esteroides que atuam na fisiologia do testículo. A função esteroidogênica e a estrutura da célula de Leydig apresentam correlação direta com o volume ocupado pelo retículo endoplasmático liso e com o número de células de Leydig por testículo (CASTRO *et al.*, 2002; NAVARRO *et al.*, 2004).

### **3.4. Epidídimo**

Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito. Eles só adquirem motilidade e capacidade fecundante após sua passagem pelo ducto epididimário (SHUM *et al.*, 2009). O epidídimo consiste em um longo ducto, altamente enovelado e contorcido, que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente (SULLIVAN, 2004). Anatomicamente, o epidídimo pode ser dividido em quatro regiões principais: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Esta regionalização baseia-se no estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência dos diferentes tipos celulares que compõem seu epitélio (HERMO e ROBAIRE, 2002; CORNWALL, 2009). Cada região do epidídimo apresenta diferentes funções, desde a absorção de fluidos vindos do testículo até capacitação do espermatozoide para fecundação (ROBAIRE e VIGER, 1995; CORNWALL, 2009).

As células epididimárias também apresentam funções diferenciadas, que são necessárias para a função deste órgão, como secreção e absorção de proteína (células principais), endocitose (células claras), atividade secretória responsável pela acidificação do fluido luminal (células claras e estreitas), defesa imune, fagocitose e produção de antioxidantes (células basais) (HERMO e ROBAIRE, 2002; FRANÇA *et al.*, 2005; CORNWALL, 2009). Assim, o epitélio epididimário cria um microambiente altamente especializado responsável pelo transporte, maturação, estocagem e proteção espermática (ROBAIRE e VIGER, 1995; HERMO e ROBAIRE, 2002).

A maturação espermática é definida pela aquisição da habilidade de fertilização pelos espermatozoides (SULLIVAN *et al.*, 2005; CORNWALL, 2009). O transporte dos espermatozoides através do ducto epididimário depende do gradiente de pressão hidrostática diferencial entre as porções proximal e distal do ducto epididimário, da atividade contrátil da parede do ducto, controlada pelo sistema nervoso autônomo e da ação de andrógenos (COSENTINO e COCKETT, 1986; ROBAIRE e VIGER, 1995; KLINEFELTER, 2002).

A regulação destes mecanismos garante um tempo do trânsito espermático adequado para a ocorrência da maturação espermática (KEMPINAS *et al.*, 1998; FRANÇA *et al.*, 2005). O tempo da passagem dos espermatozoides pelo ducto epididimário é espécie-específico, variando de 3 a 15 dias (COSENTINO e COCKETT, 1986). Uma redução nesse tempo pode interferir no processo de maturação espermática, porque o tempo disponível dos processos requeridos para a aquisição da capacidade fértil fica diminuído. Uma alteração no tempo de trânsito espermático também influi na quantidade de espermatozoides disponíveis para a ejaculação (KLINEFELTER, 2002).

### 3.5. Espermatozoides e Fertilidade

Os espermatozoides são células altamente especializadas, com a função de fertilizar o ovócito, sendo morfológicamente divididos em cabeça e cauda. A cabeça contém o núcleo haploide, com cromatina altamente compactada, e o acrossoma, uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. Ele é derivado do aparelho de Golgi, sendo formado durante a espermiogênese. A cauda é formada por um longo flagelo composto de três peças: intermediária, principal e terminal. Na peça intermediária existe grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em forma de hélice, possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática (MOURO, 2012).

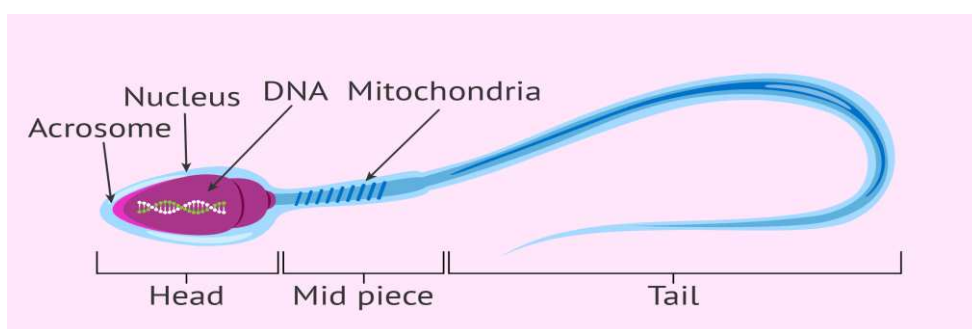


Figura 4: estrutura do espermatozoide

As análises espermáticas *in vitro* permitem avaliar parâmetros morfofuncionais de espermatozoides, que podem ser correlacionados com a fertilidade. Motilidade, morfologia e concentração espermática são os parâmetros tradicionais mais simples a serem avaliados (BARTH e OKO, 1989). O potencial fecundante depende, além de um mínimo de espermatozoides móveis por amostra, das características do seu movimento, do percentual de células morfológicamente normais em preparações úmidas usando

microscopia de contraste de fase, da integridade nuclear e estrutural de membranas, utilizando-se diferentes fluorocromos, além da integridade funcional dessas membranas, a partir dos testes hiposmóticos (SANCHEZ-PARTIDA *et al.*, 1999; RIGAU *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; O'MEARA *et al.*, 2008).

Apesar da motilidade ser somente um dos principais atributos de um espermatozoide fértil, este parâmetro continua sendo o primeiro e amplamente utilizado como indicador da função espermática. A motilidade é a manifestação da competência estrutural e funcional do espermatozoide, estando positivamente correlacionada com a integridade de membrana e morfologia normal (PEÑA MARTÍNEZ, 2004; NEVES, 2008). Anormalidades no espermatozoide têm sido tradicionalmente classificadas por localização do defeito em relação às regiões celulares como cabeça e cauda, ou classificadas quanto a defeitos maiores, que incluem a maioria das anomalias da cabeça e peça intermediária, gota citoplasmática proximal e alterações individuais presentes numa percentagem elevada, e defeitos menores como cabeças de espermatozoide destacadas e gotículas citoplasmáticas distais (MENON *et al.*, 2011).

Espermatozoides com DNA danificado são capazes de fertilizar óvulos (O *et al.*, 1988), causando maior incidência de anormalidades estruturais em embriões implantados (CHEN *et al.*, 2001) devido ao retardo na condensação da cromatina espermática e replicação do DNA no primeiro ciclo celular do processo espermatogênico (YING *et al.*, 1999). Assim, há cada vez mais evidências reconhecendo o impacto paterno no desenvolvimento embrionário, normalidade e bem-estar da prole (WAI-SUN *et al.*, 2006). Os efeitos apresentados na fertilidade quando o macho é tratado está muitas vezes associado à baixa qualidade espermática e dano a integridade de DNA (GARCIA *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2015) ou devido ao estresse oxidativo como foi observado em hamster (CHEN *et al.*, 2002).

Animais machos tratados com finasterida apresentaram redução do potencial de fertilidade levando ao aumento da perda pós-implantação (GARCIA *et al.*, 2012) e os que receberam betametasona apresentaram redução de potencial de fertilidade reflexo do aumento da perda pré-implantação (BORGES *et al.*, 2015). Alguns desses efeitos podem ser progressivos e reversíveis, como o tratamento com extrato de folha de *Mentha arvensis* que provocou redução da fertilidade sem mortalidade fetal com 40 dias de tratamento. No entanto, com 60 dias de tratamento, verificou-se inibição completa da fertilidade, sendo reestabelecida com pausa de 30 dias (SHARMA; JOCOB, 2001).

Tratamento com óleo essencial de *Satureja khuzestania* causou redução do índice de fertilidade, perda pré-implantação, aumento de fecundidade (HAERI *et al.*, 2006), enquanto tratamento com extrato aquoso de *Turnera difusa* provocou redução no número de fetos por ninhada, porém não alterando parâmetros como perda pré e pós implantação, taxa de gestação ou fertilidade (BUENO *et al.*, 2009). Animais tratados com sibutramina apresentaram aumento da taxa de perda pré implantação, sugerindo genotoxicidade ou baixa qualidade espermática (FRANCIA-FARJE *et al.*, 2010).

### 3.6. 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 esponjoso 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 albugínea peniana, 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).

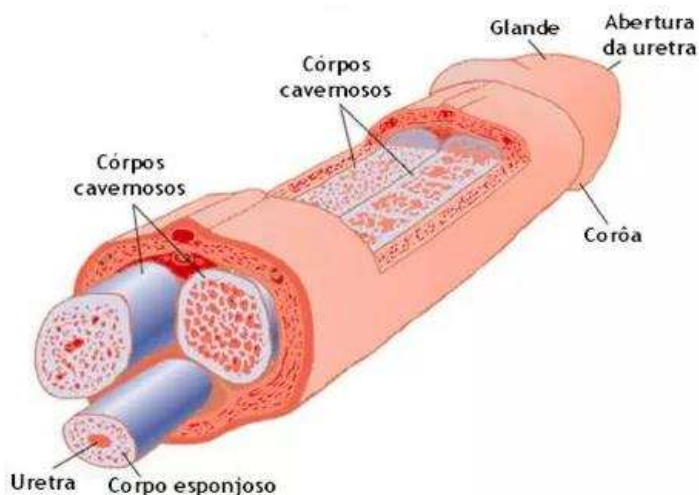


Figura 5: Estrutura pênis humano

Diferente do humano, o pênis dos roedores apresentam cartilagem na glândula do pênis, além de apresentar 3 corpos cavernosos bem definidos, um localizado

posteriormente a uretra e dois lateralmente. No entanto na glândula do pênis o corpo cavernoso apresenta-se circular (PHILLIPS *et al.*, 2015).

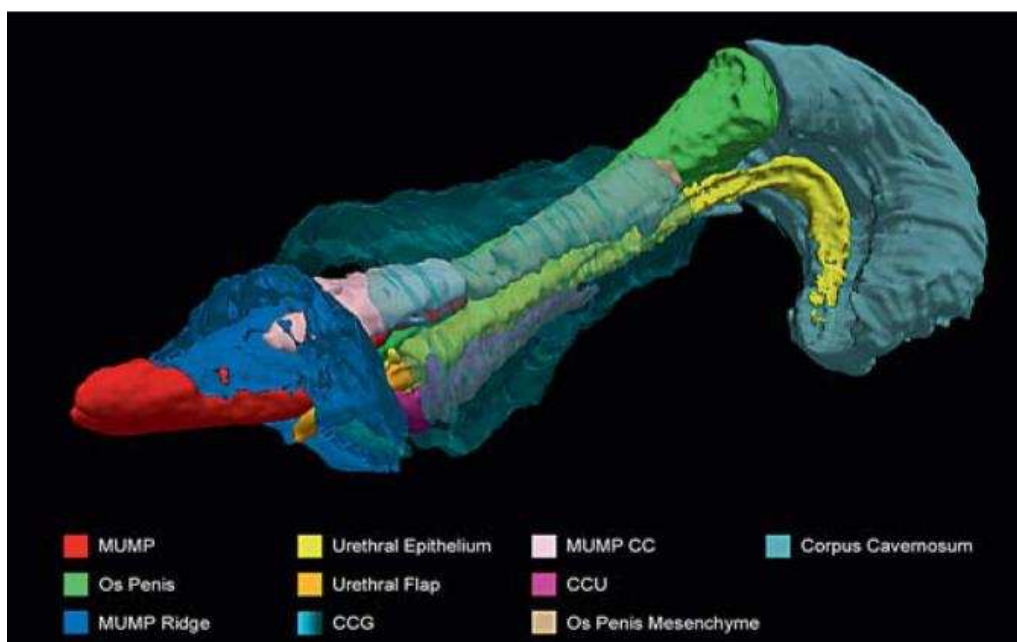


Figura 6: Mostrando a localização e os componentes penianos do camundongo (Phillips *et al.*, 2015)

O tecido conjuntivo permite o alongamento e aumento da rigidez durante a ereção e proporciona 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 alcançado apenas por mecanismos vasculares. Assim, a fim de realizar a 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 papel central na manutenção da estrutura e função da rede de nervos periféricos do pênis, da integridade estrutural dos corpos cavernosos, da albugínea, e do endotélio dos espaços cavernosos. Além disso, desempenham papel importante na regulação da diferenciação de células precursoras em células musculares lisas trabeculares.

A função erétil é um mecanismo fisiológico neurovascular complexo que depende da interação de fatores neurais, vasculares e hormonais, bem como da integridade estrutural dos componentes celulares do pênis (BIVALACQUA *et al.*, 2003; TRAISH, 2009; CASTELA *et al.*, 2011). Fisiologicamente, a ereção envolve a ação do NO (óxido nítrico), da enzima guanilil ciclase, do GMP cíclico (monofosfato de guanósina) e da enzima PDE5 (fosfodiesterase tipo 5). As PDEs de mamíferos formam uma grande família e estão subdivididas de acordo com a ordem de descoberta, sequência de aminoácidos e características catalíticas e regulatórias. Estas enzimas hidrolisam os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, às suas formas inativas 5´monofosfatos (BALLARD *et al.*, 1998; UCKERT *et al.*, 2006a; SCHWARZ *et al.*, 1992).

A estimulação sexual faz com que o NO seja liberado de terminais nervosos e de células endoteliais sobre os corpos cavernosos do pênis, ocorrendo assim a ativação da enzima guanilil ciclase que aumenta a conversão de GTP para cGMP. O cGMP se liga com elevada afinidade à 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). Alguns fármacos como o citrato de sildenafila podem atuar neste processo, como um inibidor potente e seletivo da PDE5 que está presente em vários tecidos tais como o vascular, o muscular liso, uterino e placentário (UCKERT *et al.*, 2006 b; FAN CHUNG, 2006).

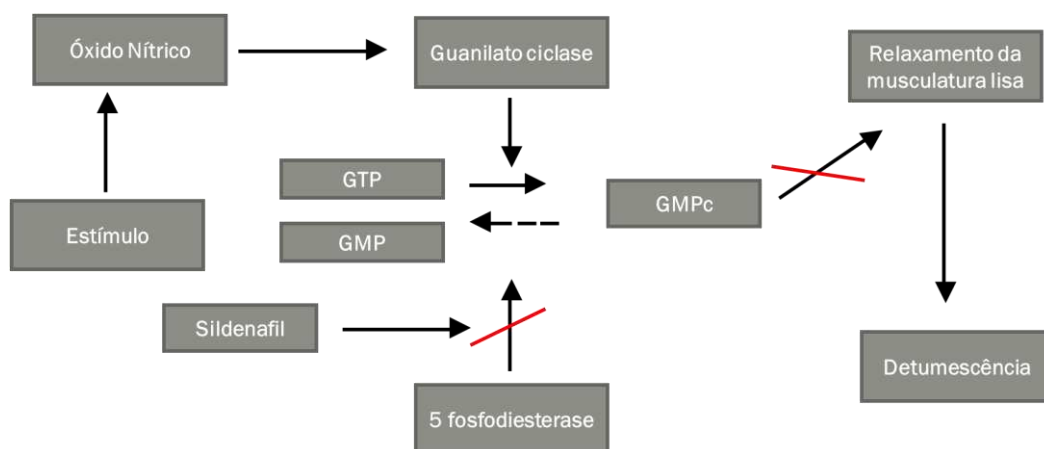


Figura 7: Mecanismo de ereção e atuação do Sildenafil

Histologicamente, durante a ereção, o pênis é capaz de acumular sangue sob pressão, num processo denominado função veno-oclusiva: 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 no corpo do pênis é ocluído, a pressão corporal se eleva causando assim a ereção peniana. Quando o músculo liso trabecular está totalmente relaxado, a pressão intravenosa, que ocorre devido crescimento da trabecula, 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).

### **3.7. Estresse oxidativo**

O conceito de estresse oxidativo foi introduzido por Sies (1985), sendo definido como desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelos sistemas de proteção antioxidante (PERSSON *et al.*, 2014). ERO e ERN são termos utilizados coletivamente para descrever radicais altamente reativos de oxigênio e nitrogênio, respectivamente, bem como derivados não radicais. Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O<sub>2</sub> e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, os quais provocam a redução incompleta de O<sub>2</sub> (GODIC *et al.*, 2014).

O funcionamento celular normal é dependente de reações de óxidorredução e como esse processo é feito geralmente em etapas, surge a oportunidade da formação de compostos intermediários com elétrons desemparelhados denominados de radicais livres. Radicais livres são moléculas que apresentam um elétron não emparelhado no orbital externo, o que as tornam muito reativas a qualquer outro tipo de molécula como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são resultantes do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) sendo o O<sub>2</sub> a principal fonte de radicais livres da célula (RIBEIRO *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2011).

Todas as células em organismos eucarióticos contêm poderosas enzimas antioxidantes (SIES, *et al.*, 1997). Por meio da ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST), o organismo mantém a

concentração de EROs dentro dos limites fisiológicos, o que forma o mecanismo antioxidante enzimático (RIBEIRO *et al.*, 2005). A SOD converte enzimaticamente o radical superóxido ( $O^{2-*}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (DROGE, 2002) enquanto a CAT é responsável pela decomposição de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (AEBI, 1984). A GST é responsável pela desintoxicação celular contra substratos exógenos como medicamentos. Essa desintoxicação ocorre através de conjugados de glutathione com xenobióticos e produtos aldeídicos produzidos na peroxidação lipídica, tornando os produtos mais solúveis em água (HABIG *et al.*, 1974; HERMES-LIMA, 2004).

O malondialdeído (MDA) é um produto de oxidação lipídica sendo importante marcador de estresse oxidativo, determinado para quantificar a peroxidação lipídica no tecido (JANERO, 1990). O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena, com alta afinidade pelas hemoproteínas ferrosas, que está envolvido em importantes eventos fisiológicos. Sua relevância biológica na neurotransmissão, anti-inflamação e sua função como molécula reguladora no controle do relaxamento do músculo liso e na inibição da adesão plaquetária justifica sua mensuração em campos experimentais (RICART-JANÉ *et al.*, 2002; DROGE, 2002). Adicionalmente, o NO está relacionado ao controle da dinâmica dos complexos juncionais da barreira testicular (GILIO *et al.*, 2008).

Antioxidantes exógenos, componentes da dieta, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo (RIBEIRO *et al.*, 2005). Os antioxidantes não enzimáticos mais importantes são as vitaminas C e E (FALLAHI *et al.*, 2015). Entretanto, alguns tipos de alimentos, ricos em gorduras trans, ácidos graxos, podem induzir a liberação de radicais livres quando metabolizados pelas células e produzir lesões (BRASILEIRO FILHO, 2011).

O estresse oxidativo é um fator chave envolvido na infertilidade masculina. As EROs podem ter efeito positivo ou negativo na viabilidade do espermatozoide. Isto depende da concentração e do tempo de exposição a esses radicais. Fisiologicamente, é produzida pequena quantidade de EROs necessária para a capacitação (processo em que o espermatozoide se torna capaz de penetrar nos óvulos), motilidade e fertilidade dos espermatozoides. Entretanto, o aumento excessivo de EROs resulta em prejuízo, como perda da motilidade e disfunção das organelas, como exemplo as mitocôndrias (FALLAHI *et al.*, 2015).

#### 4. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. 105: 121-126, 1984
- ALOK, S.; RATENDRA, K.; RAMANDEEP, S. Nature's Aphrodisiacs - A Review of Current Scientific Literature. *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research*. v. 3, n. 2, p. 1 - 20, 2013.
- 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 Mediciniais*. 8:1-4, 2006.
- BALLARD, S.A., GINGELL, C.J., TANG, K., TURNER, L.A., PRICE, M.E., NAYLOR, A.M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol*. 159 (6): 2164-71, 1998.
- BARILLI, S.L.S, MONTANARI, T. An experimental investigation on effect of the medicinal plant *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen on gestation. *Reprodução e Climatério*. 23:72-76, 2008.
- BARTH, A.D., OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, IA: Iowa University Press, p. 285, 1989
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*. 44(5): 818-833, 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.

- BORGES, C.D.S., DIAS, A.F.M.G., SILVA, P.V., ROSA, J.L., GUERRA, M.T., SILVA, R.F., KIGUTI, L.R.A., PUPO, A.S., KEMPINAS, W.D.G. Long-term adverse effects on reproductive function in male rats exposed prenatally to the glucocorticoid betamethasone. *Toxicology*. 19:4–11, 2015.
- BRASILEIRO FILHO, G.B. Bogliolo, Patologia. 8º edição. Ed. Guanabara Koogan, p. 1524, 2011
- BUENO, R.T., BUENO, R.T., HETZL, A.C., CAMARGO, I.C.C., GRACIANO, S.J., FREI, F., MESQUITA, S.F.P. Avaliação dos efeitos do extrato aquoso de Turnera diffusa na histologia testicular e ovariana e nos parâmetros reprodutivos de ratos Wistar Evaluation of effects of Turnera diffusa aqueous extract in the testicular and ovarian histology and reproductive. *Biosaúde*. 11 (18): 29–42, 2009.
- 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.
- CARRO-JUA´REZ, M., RODRI´GUEZ-SANTIAGO, M.G., FRANCO, M.A., HUELETL-SOTO, M.E. Aphrodisiac Activity of the Aqueous Crude Extract of Purple Corn (*Zea mays*) in Male Rats. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 22(4):637-645, 2017.
- CASTELA, A., VENDEIRA, P., COSTA, C. Testosterone, endothelial health, and erectile function. *International Scholarly Research Network ISRN Endocrinology*. 2011:1-7, 2011
- 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*. 35: 493-498, 2002.
- CHATURAPANICH, G., CHAIYAKUL, S., VERAWATNAPAKUL, V., PHOLPRAMUOL, C. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatic blood flow in male rats. *Reproduction Research*. 136 (4): 515- 522, 2008.
- CHEN, H., CHEUNG, M.P.L., CHOW, P.H., CHEUNG, A.L.M., LIU, W., O, W.S. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction*. 124:491–499, 2002.

- CHEN, H.W., JIANG, W.S., TZENG, C.R. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril*. 75:1163–1171, 2001.
- CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*. 15: 213-27, 2009
- CORREIA JÚNIOR, C. Estudo Agrônômico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): Sazonalidade na produção de raízes e conteúdo de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 94p, 2003 (Tese, doutorado).
- COSENTINO, M.J., COCKETT, A.T.K. 1986. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. *Urol Res*. 14:229-240.
- 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.
- CREASY, D.M. Evaluation of testicular toxicology: A synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 68 (5): 408–415, 2003.
- DAMASCENO, E.M. Efeitos do extrato alcoólico de cipó-cravo *tynanthus fasciculatus* miers (bignoniaceae) sobre testículos de camundongos swiss adultos. P. 77, 2017
- DE KRETZER, D.M., LOVELAND, K.L., MEINHARDT, A., SIMORANGKIR, D., WREFORD, N. Spermatogenesis. *Human reproduction*. 13:1-8, 1998.
- De PARIS, F., NEVES, G., SALGUEIRO, J. B., QUEVEDO, J., IZQUIERDO, I., RATES, S.M. Psycopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. *Journal Ethnopharmacological*. 73: 261-269, 2000.
- DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*. 82: 47-95, 2002.
- DUMESTRE-TOULET, V., CIRIMELE, V., GROMB, S., BELOUSSOFF, T., LAVAULT, D., LUDES 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.
- ERHABOR, J.O., IDU, M. Aphrodisiac potentials of the ethanol extract of *Aloe barbadensis* Mill. root in male Wistar rats. Erhabor and Idu *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17:360, 2017

- FALLAHI, S., RAJAEI, M., MALEKZADEH, K., KALANTAR, S. M. Would Phoenix Dactyflera Pollen (palm seed) be considered as a treatment agent against males' infertility? A systematic review. 7(8): 1590-1596, 2015.
- FAN CHUNG, K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. European Journal of Pharmacology, 533(1-3): 110-7, 2006.
- FAROMBI, E.O., ADEDARA, I.A., OYENIHI, A.B., EKAKITIE, E., KEHINDE, S. Hepatic, testicular and spermatozoa antioxidant status in rats chronically treated with Garcinia kolaseed. Journal of Ethnopharmacol. 146:536–542. 2013.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20hydroxyecdysone - a review. Botany. 86: 978-987, 2008.
- 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).
- FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes- RJ. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 7: 67–72, 2004.
- FOUCHE, G., AFOLAYAN, A., WINTOLA, O.A., KHOROMBIL, T.E., SENABE, J. Effect of the aqueous extract of the aerial parts of *Monsonia angustifolia* E. Mey. Ex A. Rich., on the sexual behaviour of male Wistar rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. 15: 1 - 10, 2015.
- FRANÇA, L.R., HESS, R.A., DUFOUR, J.M., HOFMANN, M.C., GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. Andrology. 4:189-212, 2016.
- FRANÇA, L.R., AVELAR, G.F., ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. Theriogenology. 63(2): 300- 318, 2005.
- FRANCIA-FARJE, L.A.D., SILVA, D.S., VOLPATO, J.T., FERNANDES, G.S.A., CARNIETTO, N., CICOGNA, A.C., KEMPINAS, W. DE G. Sibutramine effects on the reproductive performance of pregnant overweight and non-overweight rats. Journal of toxicology and environmental health. Part A. 73 (13–14): 985–90, 2010.

- FREITAS, C.S., BAGGIO, C.H., Da SILVA-SANTOS, J.E., RIECK L.; De MORAES, C.A., CORREA, J.R.C., MING, L.C., CORTEZ, D.A.G., MARQUES, M.C.A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Science*. 74: 1167-1179, 2004.
- GARCIA, P.V., BARBIERI, M.F., PEROBELLI, J.E., CONSONNI, S.R., MESQUITA, S.DE F., KEMPINAS, W.DE G., PEREIRA, L.A. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertility and Sterility*. 97(6): 1444–1451, 2012.
- GILIO, J. M., BORELLA, M. I., CAMARGO, A. C. M., SILVA, C. A. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. *ConScientiae Saúde*. 7(1): 69-76, 2008.
- GODIC, A., POLJAK, B., ADAMIC, M., DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, p. 1-6, 2014.
- 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  $\beta$ -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.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249(22): 7130-7139, 1974.
- 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.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: WILEY & SONS, J., HOBOKEN, N. J. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Ed. K. B. Storey, p. 640, 2004.

- HERMO L, ROBAIRE B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT, editors. The Epididymis- from molecules to clinical practice. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher 81-102, 2002.
- HERMO, L., PELLETIER, R. M., CYR, D. G., SMITH, C. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*. 73: 243-278, 2010.
- HESS, R.A., FRANÇA, L.R. Sertoli cell biology. Chapter 3: Structure of the Sertoli cell. Ed. Elsevier, p. 19-40, 2005.
- ILODIGWE, E.E., IGBOKWE, E.N., AJAGHAKU, D.L., IHEKWEREME, C.P. Aphrodisiac Activity of Ethanol Root Extract and Fractions of *Landolphia dulcis* (Sabine) Pichon. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*. 4 (2): 813 - 818, 2013.
- JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 9: 515-540, 1990.
- 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 βecdisona. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 11:247-256, 2009.
- KARL, J., CAPEL, B. Sertoli cell of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*. 203: 323-333, 1998.
- KEMPINAS, W.G., SUAREZ, J.D., ROBERTS, N.L., STRADER, L., FERRELL, J., GOLDMAN, J.M., KLINEFELTER, G.R. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biology of Reproduction*. 59, 890–896, 1998.
- KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Cap. 20 Espermatogênese. 2º edição. Ed. Elsevier, p. 573-595, 2008.
- KLINEFELTER, G.R. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: 29 Robaire B, Hinton BT, editors. The Epididymis – from

- molecules to clinical practice. 30 New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher. 353-369, 2002.
- KRANE, R.J., GOLDSTEIN, I., SAENZ DE TEJADA, I. Impotence. New England Journal of Medicine. 321:1648-1659, 1989.
- LEBLOND, C.P., CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Annals New York Academy of Sciences, p. 548-573, 1952.
- LEJEUNE, H., HABERT, R., SAEZ, J. M. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. Journal of Molecular Endocrinology. 20: 1-25, 1998.
- LORENZI, H.E., MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.
- MACHADO, L.H.B. As representações entremeadas no comércio de plantas medicinais em Goiânia/GO: uma reflexão geográfica. Sociedade & natureza. (Online). 21 (1): 159-172,2009.
- 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: Cytel, p:323-32, 2000.
- MAGALHÃES, P.M. de. Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia*. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 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
- MATTA, A.P.L.F. Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (spreng.) pedersen sobre testículo e pênis de camundongos.p.93, 2012.
- 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.
- MELO, F.C.S.A., MATTA, S.L. P., PAULA, T. A. R., GOMES, M. L. M., OLIVEIRA, L.C. The effects of *Tynanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. Biological Research. v. 43, n. 4, p. 445 - 450, 2010.
- MENON, A.G., BARKEMA, H.W., WILDE, R., KASTELIC, J.P., THUNDATHIL, J.C. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal

- circumference in beef bulls. The Canadian Journal of Veterinary Research. 75: 241–247, 2011.
- MORAIS, A.C.T., BALARINI, M.K., MENEZES, T.P., FERRAZ, F.S., GOMES, M.L.M., MORAIS, D.B., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P. Germ cells and the seminiferous epithelium cycle in the wild rodent *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Cricetidae). IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 11( 4 2016): 61-7, 2016.
- MOURO, V.G.S. Efeito do alumínio sobre parâmetros morfológicos testiculares e epididimários e de fertilidade em ratos Wistar. p. 107, 2013
- NAVARRO, R.D., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, C.C., NEVES, M.T.D. Efeito da exposição pré e pós-natal ao ultrassom de baixa densidade sobre a célula de Leydig e demais componentes do espaço intertubular do testículo de camundongos adultos. Revista Ceres. 51(296): 445-455, 2004.
- 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.
- 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.
- NETO, A.G., SILVA FILHO, A.A., COSTA, J.M.L.C., VINHOLIS, A.H.C., SOUZA, G.H.B., CUNHA, W.R., SILVA, M.L.A.E., ALBUQUERQUE, S., BASTOS, J.K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. Phytomedicine. 11: 662-665, 2004
- NEVES, M. M. 2008. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. 117p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

- NICOLOSO, F., FORTUNATO, R., FOGAÇA, M. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. *Ciência Rural*. 29:277–281, 1999.
- 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
- O. W.S., CHEN. Q., CHOW, P.H. Effects of male accessory sex gland secretions on early embryonic development in the golden hamster. *Journal of Reproduction and Fertility* 84: 341-344, 1988.
- O'DONNELL, L., ROBERTSON, K. M., JONES, M. E., SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Review*. 22(3): 289-318, 2001.
- O'MEARA, C.M., HANRAHAN, J.P., PRATHALINGAM, N.S., OWEN, J.S., DONOVAN, A., FAIR, S., WARD, F., WADE, M., EVANS, A.C., LONERGAN, P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams after cervical insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 69:513-522, 2008.
- OLIVEIRA, P.F., ALVES, M.G. Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis. Ed. Springer, p.75, 2015.
- OTOFUGI, G.M. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. p.177, 2005 (Dissertação, mestrado).
- PANDE, M., PATHAK, A. Effect of ethanolic extract of *Ocimum gratissimum* (Ram tulsi) on sexual behaviour in male mice. *International Journal of PharmTech Research*. 1(3): 468 - 473, 2009.
- PEÑA MARTÍNEZ, A. I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 209-224, 2004.
- PERSSON, T., POPESCU, B. O., CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 1-11, 2014
- PHILLIPS, B. T., GASSEI, K., ORWIG, K. E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 365: 1663-1678, 2010.

- QARAWI, A.A. Stimulatory effect of the aqueous extract of *Ruta chalepensis* on the sex organs and hormones of male rats. *The Journal of Applied Research*. 5(1): 206 - 211, 2005.
- 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). 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, p.1241-1242, 2008.
- RATES, S.M.K., GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para seu emprego terapêutico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 12: 85-93, 2002.
- RIBEIRO, S.M.R., QUEIROZ, J.H., PELÚZO, M.C.G., COSTA, N.M.B., MATTA, S.L.P., QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*. 21(3): 133149, 2005.
- RICART-JANÉ, D., LLOBERA, M., LÓPEZ-TEJERO, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 6(2): 178-185, 2002.
- RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRÍGUEZGIL, J. E. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 56(5): 801-815.
- ROBAIRE, B., VIGER, R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction* 52(2): 226-36, 1995.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*. 38:312–318, 2003.
- ROOSEN-RUNGE E.C. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Anatomical Record*. 123 (4): 385-398, 1955.
- ROOSEN-RUNGE E.C., GIESEL L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *American Journal of Anatomy*. 87(1): 1-30, 1950.
- 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. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, Chapter 1, p. 1-40, 1990.

- RUSSELL, L.D., FRANÇA, L.R. Building the testis. *Tissue and Cell*. 27(2): 129-147, 1995.
- SAENZ DE TEJADA, I., CARSON, M.P., DE LAS MORENAS, A., GOLDSTEIN, I., TRAIISH, A.M. Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *American Journal of Physiology*. 261:1078-1085, 1991.
- SALTZMAN, W., TARDIF, S.D., RUTHERFORD, J.N. Hormones and reproduction of vertebrates. Chapter 13: Hormones and reproductive cycles in primates. Ed. Elsevier. 5: 1-35, 2010.
- SANCHEZ-PARTIDA, L.G., WINDSOR, D.P., EPPLESTON, J., SETCHELL, B.P., MAXWELL, W.M. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology*. 20: 280-288. 1999.
- SANDRONI, P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. *Clinical Autonomic Research*, v. 11(5), p. 303-307, 2001.
- SCHWARZ, T.F. Erythema infectiosum infection can cause intrauterine fetal death. Possibilities of diagnosis and treatment. *Fortschritte Der Medizin*. 110(15): 289, 1992.
- SHAMLOUL, R. Natural aphrodisiacs. *Journal of Sexual Medicine*, 7:39-49, 2010.
- SHARMA, N., JOCOB, D. Antifertility investigation and toxicological screening of the petroleum ether extract of the leaves of *Mentha arvensis* L. in male albino mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 75(1): 5–12, 2001.
- SHARPE, R. M., MADDOCKS, S., KERR, J. B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *American Journal of Anatomy*. 188: 3-20, 1990.
- SHIOBARA, Y., INOUE, S., KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry*. 32: 1527-1530, 1993
- SHUM, W.W., DA SILVA, N., BROWN, D., BRETON S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *Journal of Experimental Biology*. 212: 1753-61, 2009
- SIES, H. Oxidative stress. London, Academic Press, p. 1 - 507, 1985.
- SILVA JÚNIOR, A., OSAIDA, C.C. Ginseng-brasileiro - novo estímulo para o campo e para o corpo. *Agropecuária Catarinense*. 18:41–44, 2005

- SILVA, M.I., RIBAS-FILHOJ, M., MALAFAIA, O., NASSIF, P. A. N., RIBAS, M. M., VARASCHIM, M., CZECHKO, L. E. A utilização da *Pfaffia* glomerata no processo de cicatrização de feridas da pele. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. 4:228-233, 2010.
- SILVA, T.C. da. Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia* paniculata (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano. 178p, 2008. (Tese Doutorado)
- SINGH, R., ALI, A., GUPTA, G., GOVINDASAMY, J. Some medicinal plants with aphrodisiac potential: A current status. *Journal of Acute Disease*. v.2, n. 3, p. 179 - 188, 2013.
- SINGH, S., GUPTA, Y. K. Aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in. *Journal of Men's Health*. 8: 75 - 77, 2011.
- SULLIVAN R. 2004. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 341-7.
- 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.
- TRAISH, A. M. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: A review. *Journal of Andrology*. 30:363-369, 2009.
- UCKERT, S., HEDLUND, P., ANDERSSON, K.E., TRUSS, M.C., JONAS, U., STIEF, C.G. Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. *European Urology* 50(6): 1194-207, 2006 a.
- UCKERT, S., OELKE, M., STIEF, C.G., ANDERSSON, K.E., JONAS, U., HEDLUND, P. Immunohistochemical distribution of cAMP- and cGMPphosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human prostate. *European Urology*. 49(4): p. 740-5, 2006 b
- VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005
- VENHUIS, B. J., BLOK-TIP, L., DE KASTE, D. Designer drugs in herbal aphrodisiacs. *Forensic Science International*, 177:25-27, 2008.

- VERNET, P., AITKEN, R.J., DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinology*.216:31–39, 2004.
- VIDAL, M.R.R. Flórmula de Viçosa. I. Chenopodiaceae e Amaranthaceae. *Revista Ceres*. 46-79, 1967.
- 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.
- WAI-SUN, O., CHEN, H., CHOW, P. H. Male genital tract antioxidant enzymes-Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 250(1–2): 80–83, 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.
- YING, Y., CHEUNG, M.P., CHOW, H.P., O, W.S. Effects of male accessory sex glands on sperm decondensation and oocyte activation during in vivo fertilization in golden hamsters. *International Journal of Andrology*. 22(2): 68–76, 1999.
- 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.
- ZIMMER. A.R., BRUXEL, F., BASSANI, V.L., GOSMANN, G. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 40: 450-453, 2006.

**CAPITULO 1:**

**Sperm DNA damage and embryonic losses caused by ROS stimulated through the  
action of *Pfaffia glomerata* extract**

**Submetido a Revista Human Reproduction (ISSN – 0268-1161)**



**Extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* induz dano de DNA no espermatozoide aarretando perda embrionária por EROs.**

F.C.R. Dias; S.L.P. Matta e colaboradores

**ABSTRACT**

Many Brazilian plants have potential promising pharmacological potential related to reproductive functions, in particular *Pfaffia glomerata*, known as Brazilian ginseng (BGE). The commercial interest in the plant is mainly due to the phytochemical quality of its tuberous roots rather in popular medicine as an aphrodisiac. Since BGE increases testosterone and systemic nitric oxide and nitric oxide participates in the route of penile erection and knowing that several studies report negative effects of compounds or plants on male fertility, acting on the spermatozoa the objective of the study was to evaluate the effects of BGE on sperm quality and male fertility for this evaluated reproductive and sperm parameters in addition to the epididymis in order to characterize the

environment in which the spermatozoa were matured and stored during treatment with BGE. Adult mice were randomly divided into 6 groups: positive control (sildenafil citrate), negative control (water), 3 groups receiving daily doses (100, 200 and 400 BGE mg / kg) and an intermittent dose (200 BGE mg / kg a every three days). After ingestion it was verified that the animals had spermatozoa with alterations in morphology, number and sperm quality, there was an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. These changes led to pre and post implantation losses in addition to increased autophagic activity.

**Palavra-chave:** membrane integrity, epididymis, embryonic losses

## INTRODUÇÃO

Muitas plantas brasileiras têm apresentado potencial farmacológico promissor relacionado a funções reprodutivas, atuando positivamente no tecido testicular e em células espermáticas (Farombi *et al.*, 2013). Particularmente a *Pfaffia glomerata*, popularmente conhecida como fáfia ou ginseng brasileiro, têm importância ornamental, alimentar e medicinal (Nicoloso *et al.*, 2001; Silva Júnior and Osaida, 2005; Silva *et al.*, 2010). O interesse comercial nesta planta se deve principalmente à qualidade fitoquímica de suas raízes tuberosas (Nicoloso *et al.*, 1999), bastante utilizadas na medicina popular como afrodisíaco (Lorenzi and Matos, 2002).

O ginseng brasileiro está incluído na categoria de afrodisíacos possivelmente por aumentar os níveis de testosterona (Matta, 2012) e de óxido nítrico sistêmico (Freitas *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006). Sabe-se que o óxido nítrico ativa a guanilato ciclase que, por sua vez, aumenta as concentrações de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), causando relaxamento, vasodilatação (Cerqueira and Yoshida, 2002) e, consequentemente, ereção peniana (Subramoniam *et al.*, 2013). Alguns fármacos comerciais, como o citrato de sildenafil, também agem aumentando os níveis de cGMP ao inibir fosfodiesterases, o que prolonga o relaxamento do tecido e, consequentemente, a ereção

(Glenn *et al.*, 2007). No entanto, o citrato de sildenafila apresenta um efeito negativo sobre os espermatozoides, promovendo aumento na motilidade espermática com ativação precoce da reação acrossômica, o que acarreta a perda da capacidade fecundante (Glenn *et al.*, 2007).

Compostos como polifenóis, flavonoides, antocianinas e carotenoides, podem atuar como pró-oxidantes em altas concentrações (Eghbaliferiz and Iranshahi, 2016). Algumas dessas classes de compostos estão presentes no extrato do ginseng brasileiro (BGE) (Matta, 2012) levando a crer que altas concentrações do extrato podem atuar como pró-oxidante. Por outro lado, essas altas concentrações podem também causar danos a fertilidade. Estudos com fêmeas tratadas com BGE mostraram que o extrato não afetou a implantação embrionária em camundongos quando administradas no período de implantação (4<sup>o</sup>- 6<sup>o</sup> dias de gestação) e pós implantação (7<sup>o</sup>- 9<sup>o</sup> dias de gestação), mas houve um aumento na mortalidade embrionária e fetal, com ocorrência de malformações quando o extrato da planta foi administrado no período pré-implantação (1<sup>o</sup> - 3<sup>o</sup> dias de gestação) (Barilli and Montanari, 2008). Não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito do BGE sobre a fertilidade masculina. O que se sabe é que camundongos tratados com o extrato dessa planta nas concentrações de 300 e 400mg/Kg apresentaram aumento nas concentrações de testosterona e aumento de percentual corpos cavernosos, além de redução na produção espermática diária (Matta, 2012). Vários estudos reportam efeitos negativos de compostos ou plantas sobre a fertilidade masculina, atuando sobre os espermatozoides (Aladakatti and Ahamed, 2005a, 2005b; Gadelha *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2011; Mahajan *et al.*, 2012; Oshio *et al.*, 2015). Sabe-se que modificações nos ambientes aonde ocorrem a produção e maturação espermática pode levar ao comprometimento da fertilidade, por interferir na qualidade dos espermatozoides (Vernet *et al.*, 2004). Neste sentido, não se conhece os efeitos do ginseng brasileiro sobre o epidídimo, órgão responsável por promover eventos de maturação, transporte e estocagem espermática (Robaire and Hinton, 2015). De fato, danos ao espermatozoide podem trazer impacto no desenvolvimento embrionário e no bem-estar da prole (Wai-Sun *et al.*, 2006).

Considerando o grande uso comercial de produtos oriundos dessa planta, bem como a ausência de informações sobre seu efeito nas funções reprodutivas, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do BGE sobre a qualidade espermática e fertilidade masculina. Para isso, foram testadas diferentes concentrações do extrato e avaliados parâmetros reprodutivos e espermáticos. O epidídimo também foi avaliado

quanto a marcadores de estresse oxidativo e viabilidade espermática, a fim de caracterizar o ambiente em qual os espermatozoides foram maturados e armazenados durante o tratamento com o BGE.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Biológico**

A matriz de *P. glomerata* (AC22) 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, Brasil, e cultivada em estufas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. As plantas usadas neste experimento foram provenientes do banco de germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFV (LCT – Bioagro – UFV), sendo cultivadas no campo experimental localizado no Sítio Bela Vista, Vila Valério, Espírito Santo, Brasil (18°58'55.5"S 40°15'17.8"W) e coletadas em novembro de 2015. As amostras foram coletadas ao completar 1 ano de plantio, secas em estufa a 55°C e trituradas em moinho de facas (SL32, Solab). Um espécime testemunho foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger - CESJ-UFJF, Minas Gerais, Brasil (CESJ- 63317).

### **Extração**

A preparação do extrato hidroalcoólico da raiz do ginseng brasileiro (*P. glomerata*) (BGE) e as análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. O extrato foi obtido a partir de 700g de raiz triturada, deixado em maceração por 48h com álcool etílico 95% e em seguida submetida à percolação com o mesmo solvente. Após extração exaustiva, o extrato foi levado ao evaporador rotativo com pressão reduzida e em seguida liofilizado (liofilizador VirTis BenchTop K) para completa remoção do solvente, apresentando um rendimento de 9,3%.

### **Animais**

Foram utilizados 60 camundongos Swiss machos em idade reprodutiva (55 dias) provenientes do biotério central da UFV. Eles foram mantidos em gaiolas de propileno com 5 animais cada, em ambiente de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade (60-70%) e luz controladas (ciclo claro-escuro de 12:12 h). Todos eles tiveram acesso a alimento (Ração comercial) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais seguiram os padrões determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação

Animal (CONCEA), sendo aprovado pela Comissão de Ética em uso de animais (CEUA/ UFV número de protocolo 044/2015).

### **Desenho experimental**

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=10/ grupo). Animais controles receberam 0,5 mL de água (G1; controle negativo) e citrato de sildenafil receberam 7 mg/kg em 0,5 mL de água (G2; controle positivo) por gavagem. Já os animais tratados diariamente com o BGE foram distribuídos em grupos que receberam 100 mg/kg (G3), 200 mg/kg (G4), 400 mg/kg (G5). Animais do último grupo (G6) receberam BGE 200 mg/kg (3-3 dias). As concentrações do extrato foram ressuspensas em 0,5 mL de água e administradas via gavagem. Essas doses foram escolhidas baseadas em estudos prévios com a planta (Matta, 2012). Utilizou-se o citrato de sildenafil como controle positivo por ele ser um inibidor potente e seletivo da PDE5 causando aumento na produção de óxido nítrico (Fan Chung, 2006; Ückert *et al.*, 2006) e por causar antecipação da reação acrossômica (Glenn *et al.*, 2007)

O tratamento com BGE teve duração de 42 dias consecutivos em todos os grupos experimentais, considerando o tempo de duração do ciclo do epitélio seminífero no camundongo (Russell *et al.*, 1990). Com exceção de G6 receberam BGE a cada 3 dias neste período, totalizando 14 doses.

### **Acasalamento natural e análise de fertilidade**

No 43º dia de experimento, machos foram acasalados com fêmeas não tratadas, na proporção de 1: 2, por 72 h. Esfregaços vaginais foram feitos durante o período de acasalamento (às 48 e 72 h) para confirmação do acasalamento. O momento de identificação de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado como o Dia 0 da gestação. Ao final deste período, machos e fêmeas foram separados, sendo as fêmeas mantidas até o Dia 17 da gestação. Já os machos foram mantidos em gaiolas individuais por 4 dias, sendo posteriormente eutanasiados.

A eutanásia das fêmeas foi feita utilizando-se tiopental (30mg/Kg intraperitoneal). O aparelho genital feminino foi removido e os ovários foram dissecado, pesados e avaliados quanto a presença e número de corpos lúteos por microscopia de luz. Para isso, secções histológicas de 3µm de espessura foram obtidas com intervalo de 60µm, e avaliadas em microscópio (Olympus, CX 40, Tokyo, Japan). Já os cornos uterinos foram abertos para quantificação de áreas de implantação e número de fetos

viáveis e não-viáveis. Fetos viáveis (de acordo com características morfológicas embrionárias) são considerados aqueles que nasceriam vivos caso as fêmeas chegassem a termo.

A partir daí, índices de fertilidade foram determinados: índice de acasalamento feminino (número de fêmeas com espermatozoides presentes no esfregaço vaginal /número de fêmeas usadas no acasalamento x 100), índice de acasalamento masculino (número de machos com espermatozoides presentes no esfregaço vaginal /número de machos usados no acasalamento x 100), índice de fertilidade masculina (número de machos que emprenharam fêmeas/ número de machos colocados para acasalar x 100), taxa de prenhez (número de fêmeas prenhes/ número de fêmeas com espermatozoides presentes no esfregaço vaginal x 100), potencial de fertilidade (sítios de implantação/ número de corpos lúteos x 100), taxa de perda de pré-implantação (número de corpos lúteos - número de implantações / número de corpos lúteos x 100) e taxa de perda pós-implantação (número de implantação - número de fetos viáveis / número de implantações x 100) (Almeida *et al.*, 2000; Stedile *et al.*, 2013).

#### **Coleta dos órgãos masculinos após período de acasalamento**

Os animais foram pesados e eutanasiados (a mesma metodologia descrita acima) 4 dias após o período de acasalamento, para reposição da reserva espermática na cauda do epidídimo. Os epidídimos e testículos foram removidos, dissecados e pesados para obtenção dos pesos absoluto e relativo. Posteriormente os epidídimos e testículo direitos foram congelados (-20°C) para análise do trânsito espermático, enquanto que os epidídimos esquerdos foram utilizados para realização de análises espermáticas.

#### **Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário**

As espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermatogênese) e o espermatozoide da (cabeça /corpo) e da cauda foram contados como descrito por Robb *et al.* (1978) e modificado por Fernandes e colaboradores (Fernandes *et al.*, 2007). Resumidamente, o testículo foi descapsulado, pesado e homogeneizado em 5 mL de NaCl a 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Em seguida diluído 5 vezes (1:5) na mesma solução e transferido para a câmara de Neubauer, onde foi contabilizado o número de espermátides resistentes a homogeneização. Para determinar a produção espermática diária de espermatozoides, o

número de espermátides por testículo foi dividido por 4,84, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de camundongos (Robb *et al.*, 1978; Fernandes *et al.*, 2007). Da mesma forma, a cabeça / corpo e cauda do epidídimo foram homogeneizados, sendo que 200 mg de tecido da cabeça/corpo e 100 mg de cauda foram homogeneizados em 1 mL de solução NaCl a 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato da cabeça/corpo foi diluído 2 vezes (1:2), enquanto o da cauda não passou por uma segunda diluição. Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoide de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária (Robb *et al.*, 1978; Fernandes *et al.*, 2007).

### **Avaliação espermática**

A cauda do epidídimo esquerdo foi seccionada várias vezes em placa de Petri, com auxílio de lâmina de inox, para se obter o fluido rico em espermatozoides. Este foi diluído em 500 µL de meio diluidor Tris-citrato-frutose a 37 °C, sendo retiradas alíquotas para análises de motilidade e morfologia espermáticas e avaliação da integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal.

### ***Motilidade***

A motilidade espermática foi analisada em microscópio de campo claro no aumento de 400×. Os espermatozoides foram classificados como móveis ou imóveis e a motilidade total foi expressa em porcentagem.

### ***Morfologia espermática***

Uma alíquota de 50 µL do fluido foi fixada em 100 µL de paraformaldeído a 4% , tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,4, sendo mantido refrigerado a -20 °C. Foram analisados 100 espermatozoides em preparação úmida utilizando microscópio de contraste de fase no aumento de 400 x (Bioval L-1000B, Brasil). A morfologia foi classificada quanto a defeitos de cabeça (núcleo e acrossoma), peça intermediária (quebrada, fracamente dobrada e fortemente dobrada) e peça principal (fracamente enrolada e fortemente enrolada), além de ausência ou presença de gota citoplasmática. Os resultados foram expressos em porcentagem.

### ***Integridade estrutural das membranas espermáticas***

A integridade estrutural das membranas, plasmática e acrossomal, dos espermatozoides foi avaliada pela técnica de fluorescência utilizando-se dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína (DACF) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison (Harrison and Vickers, 1990) e modificado por Zúccari (1998). Os espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) no aumento de 400x. Foram avaliados 200 espermatozoides por animal, considerando-se três categorias: íntegros (membrana plasmática e acrossomal íntegras; DACF+/IP-), lesados (membrana plasmática e acrossomal lesadas; DACF-/IP+) e semilesados (membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada; DACF+/IP+). O resultado foi expresso em porcentagem.

### **Coleta de epidídimos após o tratamento com BGE**

Para verificação da qualidade do microambiente epididimário, bem como dos espermatozoides dentro do lúmen desse órgão, 6 animais foram eutanasiados no último dia de tratamento utilizando-se tiopental (30 mg/Kg intraperitoneal). O epidídimo esquerdo foi fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 4%, 1:1 em tampão cacodilato de sódio 0.2 M, pH 7.4) para avaliação de viabilidade (Karnovsky, 1965) por 24 horas, enquanto o epidídimo direito foi congelado a -80 °C para realização de avaliação dos marcadores do estresse oxidativo.

### **Marcadores de estresse oxidativo**

O epidídimo foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) 0,2 M combinado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1M e a suspensão centrifugada a 13,8 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante (100 mg de tecido por mL) foi utilizado para a análise de atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GST), bem como da concentração de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e de malondialdeído (MDA). As análises foram realizadas em duplicata.

A atividade de SOD foi estimada pelo método da xantina-oxidase baseada na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dieterich *et al.*, 2000); A atividade de CAT foi avaliada medindo a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (Aebi, 1984) e a atividade da enzima GST foi estimada por espectrofotometria através da formação do conjugado glutathiona-

2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig *et al.*, 1974) e calculado a partir da taxa de oxidação de NADPH. A peroxidação lipídica foi avaliada em epidídimo analisando os níveis de malondialdeído (MDA). Para isso alíquotas de epidídimo (100mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) 0,2 M e encubadas em ácido tiobarbitúrico para ver os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO) (Wallin *et al.*, 1993). A concentração de proteína total das amostras foi mensurada utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão. Os marcadores de estresse foram normalizados pelos níveis de proteínas totais (Lowry *et al.*, 1951).

A produção de NO foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess padrão (Ricart-Jané *et al.*, 2002) A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mensurada no sobrenadante através da reação do dicloridrato de fenilenoamina (OPD) e peroxidase do tipo II (Oliveira *et al.*, 2018). A conversão da absorbância em concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calculada a partir de uma curva padrão usando uma concentração conhecida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

### **Viabilidade dos espermatozoides no epidídimo**

Os epidídimos fixados em Karnovsky foram desidratados em solução crescente de etanol (70, 80, 90 % e absoluto) e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 1  $\mu\text{m}$  foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de 39  $\mu\text{m}$  entre os cortes. As secções do tecido epididimário foram coradas com laranja de acridina e iodeto de propídio (PI) para avaliar a presença de células apoptóticas. As imagens digitais foram capturadas por fotomicroscópio EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá) e células foram classificadas como células viáveis (núcleo verde) e células não-viáveis (núcleo vermelho-laranja) (Giri and Roy, 2016).

### **Análises estatísticas**

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de  $p \leq 0,05$ . Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Além disso foi feita a análise de Componentes Principais (PCA) para identificar possíveis clusters, a fim de eliminar redundâncias e definir as variáveis mais importantes na separação de grupos. Os dados foram normalizados, sendo que o nível de importância de cada variável foi determinado pelos valores dos auto vetores (McGarigal *et al.*, 2000). Portanto, valores de correlação substancial foram mostrados para cada atributo em componentes principais (PC) 1 e 2. O nível de importância de cada PC foi determinado pelo método de Broken-stick, onde os autovalores excederam o esperado foram mantidos para interpretação. Análises foram realizadas utilizando o programa Fitopac 2.1.2.85 (Shepherd, 2010).

## **RESULTADOS**

### **BGE alterou índices de fertilidade**

Os resultados do índice de acasalamento feminino e masculino mostraram que todos os animais foram capazes de cruzar (Tabela 1). A capacidade dos machos de emprenhar as fêmeas foi similar entre os grupos tratados quando comparados ao controle negativo. No entanto, machos tratados diariamente com BGE, principalmente na concentração de 400 mg/kg, apresentaram maior índice de fertilidade masculina que os demais grupos. Todas as fêmeas apresentaram valores similares para peso de ovário e número de corpos lúteos ( $P > 0.05$ ; Tabela 1). No entanto, o percentual de fêmeas prenhes, apesar de ter sido encontrado espermatozoide no esfregaço vaginal, foi maior nos grupos tratados com BGE 100 e 200 mg/kg/d (Tabela 1). Os menores valores foram observados em animais tratados com BGE 200 mg/kg/3-3d e com citrato de sildenafil (Tabela 1). Apesar disso, não houve diferença entre os grupos experimentais quanto ao potencial de fertilidade ( $P > 0.05$ ; Tabela 1).

Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais para número de fetos implantados (Figura 1A) e considerados viáveis, bem como no peso destes ( $P > 0.05$ ; Tabela 1). No geral, os fetos não apresentaram mal formação ou anormalidades estruturais (Figura 1B). No entanto, fêmeas cruzadas com machos tratados com BGE 100 mg/Kg/d apresentaram maior percentual de perdas pré implantação. Já as perdas pós implantação foram maiores nos grupos de machos tratados com citrato de sildenafil e BGE 100mg/Kg/d ( $P < 0.05$ ; Tabela 1). As perdas pós implantação se caracterizaram principalmente pela presença de fetos mumificados (Figura 1C) e reabsorvidos (Figura 1D).

### **BGE reduziu o número de espermátides e produção espermática diária no testículo, bem como o número de espermatozoides**

O número de espermátides resistentes por testículo e por grama de testículo, bem como a produção espermática diária diminuiu em todos os grupos tratados com BGE e citrato de sildenafil em comparação ao controle negativo ( $P < 0,05$ ; Tabela 2). Com isso, estes grupos experimentais apresentaram redução no número de espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo em relação ao grupo controle negativo ( $P < 0,05$ ; Tabela 2). O tempo de trânsito de espermatozoides nas regiões do epidídimo permaneceram inalteradas entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ; Tabela 3).

Machos tratados com BGE apresentaram alterações nos parâmetros espermáticos, a motilidade espermática apresentou-se aumentada em machos tratados com BGE 200 mg/kg/3-3 d, bem como citrato de sildenafil ( $P < 0,05$ ; Tabela 3). Excetuando os machos do grupo controle negativo, todos os demais machos apresentaram aumento significativo no número de espermatozoides com anormalidades morfológicas ( $P < 0,05$ ; Tabela 3). Dentre as patologias espermáticas observadas, a presença de gota citoplasmática foi maior em machos tratados com BGE diariamente, nas três concentrações testadas. Animais tratados com BGE 100 mg/kg/d apresentaram maior percentual de caudas dobradas em relação aos demais grupos experimentais ( $P < 0,05$ ; Tabela 3). Além disso, machos tratados com BGE 200 mg/kg/3-3 d apresentaram menor percentual de espermatozoides com membranas, plasmática e acrossomal, íntegras, seguidos dos animais tratados diariamente com BGE em diferentes concentrações e com citrato de sildenafil ( $P < 0,05$ ; figura 2).

### **Produção de $H_2O_2$ aumentou em animais tratados com BGE alterando a atividade das enzimas CAT e GST**

A produção de  $H_2O_2$  foi maior em todos os grupos experimentais em relação ao controle negativo, enquanto apenas animais tratados com BGE 200 mg/kg/d apresentaram aumento de NO ( $P < 0,05$ ; Figura 3). A atividade da SOD não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais em relação ao controle negativo. A atividade de CAT reduziu em todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle negativo, com aumento na atividade de GST em animais tratados com BGE 200 mg/kg/3-3 d, 100 e 400 mg/kg/d, bem como animais tratados com citrato de sildenafil ( $P < 0,05$ ; Figura 3). Porém, somente animais tratados com BGE 200 mg/kg/3-3 d apresentaram redução na concentração de MDA ( $P < 0,05$ ; Figura 3).

### **Viabilidade dos espermatozoides no epidídimo**

Os animais tratados com BGE 100 mg/kg/d apresentaram células não-viáveis nas três regiões epididimárias avaliadas (segmento inicial, cabeça e cauda), assim como o citrato de sildenafil (P < 0,05; Fig. 4A e 5). Já animais tratados com o extrato na concentração de 200 mg/kg/d apresentaram maior proporção de células não-viáveis apenas na região do segmento inicial em relação às regiões da cabeça e cauda (P < 0,05; Fig. 4A e 5). Animais tratados com BGE 400 mg/kg/d e 200 mg/kg/3-3d apresentaram redução no número de células não-viáveis nas regiões da cabeça e cauda em relação aos animais do grupo controle (P < 0,05; Fig. 4A e 5).

O grupo de células não-viáveis contabilizadas compreendeu principalmente espermatozoides no lúmen do epidídimo, bem como células do interstício (Fig. 5). Dentre as células espermáticas, todos os animais experimentais apresentaram espermatozoides danificados no segmento inicial. A quantidade dessas células reduziu à medida que elas foram transportadas até a região da cauda (Fig. 5). Neste local, animais controle e tratados com BGE 200 mg/Kg/3-3d não apresentaram espermatozoides não-viáveis, diferente dos demais grupos experimentais (Fig. 5). Além disso, observou-se em todos os animais experimentais a presença de células marcadas positivamente pelos corantes laranja de acridina e iodeto de propídio no citoplasma das células do epitélio epididimário. A presença dessa marcação mostrou-se reduzida nas regiões de cabeça e cauda de animais tratados com BGE 100 e 200 mg/kg/d, bem como citrato de sildenafil. Já animais tratados com BGE 400 mg/kg/d, a marcação no epitélio da cauda mostrou focalmente localizada nas secções do ducto epididimário. Nos animais tratados com BGE 200 mg/kg/3-3d e animais controle, as marcações no epitélio não foram observadas nas demais regiões epididimárias.

Nos animais em que foi observada a marcação de autofagia, verificou-se uma área supranuclear pouco corada nas células principais presente nas regiões do segmento inicial e cabeça (Fig. 5B). Na região da cauda, observou-se um grande número de vesículas de tamanhos variáveis e vacúolos distribuídos tanto na porção basal quanto apical do epitélio (Fig. 5B).

### **Análise estatística do componente principal**

A variação total dos dados foi de 42,51%, sendo os atributos mais importantes na distinção do grupo tiveram valores de correlação > 0,6 (Figura 6). Para PC1 (eixo

horizontal) os atributos mais relevantes e seus respectivos valores de correlação foram Produção espermática diária (-0.9895), espermatozoide por órgão por cabeça/corpo (-0.8905), espermatozoide por órgão por cauda (-0.9182), espermatozoide por grama de órgão por cabeça/corpo (-0.9419), espermatozoide por grama de órgão por cauda (-0.9411), número de espermátide por testículo (-0.9895), número de espermátide por grama de testículo (-0.9667), produção espermática diária por grama de testículo (-0.9718), espermatozoide normal (-0.7275), espermatozoide com patologia (0.7275) e potencial de fertilidade (0.3988). A separação de tratamentos do controle negativo foi evidenciada no gráfico sendo principalmente pela redução no número de espermatozoides, produção espermática, morfologia do espermatozoide.

Na PC2 (eixo vertical), os tratamentos foram separados principalmente pelo Trânsito em dias CC (0.5376), pelo Trânsito em dias C (0.5775), Trânsito total (0.6978), Sítio de implantação (0.5671) os atributos mostrados com seus respectivos valores de correlação (figura 7). A separação do grupo descontínuo fica evidente no gráfico, sendo essa diferença devido ao do número de espermatozoides no epidídimo, espermátides no testículo, produção diária de espermatozoides, redução do número de espermatozoides com patologias em relação aos tratamentos.

## **DISCUSSÃO**

O presente estudo descreve as primeiras evidências sobre o efeito do ginseng brasileiro sobre a viabilidade espermática e fertilidade masculina em camundongos, bem como as condições do ambiente epididimário em que os espermatozoides foram maturados e estocados. De forma geral, a administração diária com BGE, nas três concentrações testadas, promoveu redução no número de espermátides resistentes no testículo e prejuízo à produção espermática diária, culminando com redução no número de espermatozoides epididimários. Apesar da qualidade espermática ter diminuída em todos os animais experimentais, somente machos tratados com BGE 100 mg/kg/d apresentaram perdas embrionárias pré e pós implantação.

Os danos causados pelo BGE, independente da concentração ou forma de administração (diária e 3-3 d), na produção espermática diária e no número de espermatozoides presentes no epidídimo podem ter sido causados por compostos contidos do extrato. Estes compostos provavelmente promoveram um aumento na produção de EROS e conseqüente prejuízo à atividade das enzimas antioxidantes CAT e aumento da GST, mostrando que a segunda linha de defesa esta ativa. Sabe-se que SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos deletérios de oxi-radicais na

célula pela catálise do radical  $O^{\cdot-2}$  em  $H_2O_2$ , que é rapidamente degradado pela CAT e GST (Aitken and Roman, 2008). No presente trabalho, altos níveis de  $H_2O_2$  provavelmente aumentaram a atividade de CAT até seu máximo atingindo a exaustão, com posterior decréscimo de suas atividades e habilidades em eliminar o  $H_2O_2$  (Aitken and Roman, 2008). A molécula  $H_2O_2$  é extremamente deletéria a célula, podendo atravessar camadas lipídicas e promover danos a macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA, culminando com morte celular (Garcimartína *et al.*, 2017). No entanto, no presente trabalho, não foi observado um aumento significativo na produção de MDA, um subproduto da peroxidação lipídica, no epidídimo de animais tratados com BGE, nas concentrações e nas formas de administração testadas. Este fato pode ter acontecido devido à manutenção da alta atividade da enzima GST, que foi capaz de impedir o efeito deletério de  $H_2O_2$ , evitando a produção intensa de MDA nestes animais, bem como de NO. Portanto, pode-se sugerir que a administração com BGE estimulou a produção de EROs sem desencadear o processo de peroxidação lipídica, durante o tempo de administração de 42 dias.

O metabólito NO, no entanto, teve sua concentração aumentada apenas em machos tratados com BGE 200 mg/Kg/d. Este grupo foi o único que apresentou atividade reduzida de GST, provavelmente por exaustão de sua atividade, como ocorreu com CAT. Sabe-se que GST é a principal enzima antioxidante do epidídimo. Ela está envolvida nas reações de fase II da atividade antioxidante, reduzindo a produção da peroxidação lipídica através da redução de hidroperóxidos (Hayes *et al.*, 2005). Desta forma, ela é responsável pela desintoxicação celular através de conjugados de glutathione com xenobióticos e de produtos aldeídos produzidos na peroxidação lipídica, tornando-os mais solúveis em água (Habig *et al.*, 1974). Sua atividade, bem como a de CAT, pode ser inibida diretamente por altas concentrações de NO (Kostic *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2001).

A produção de ERO pode ter influenciado negativamente o número e a qualidade de espermatozoides presentes no lúmen epididimário de animais tratados com BGE. O número está diretamente relacionado à quantidade de espermátides viáveis. Apesar do epitélio seminífero não ter sido avaliado no presente trabalho, este pode também ter entrado em processo de estresse oxidativo visto o baixo número de espermátides resistentes a homogeneização recuperadas. As espermátides têm papel crucial na qualidade dos espermatozoides, já que elas dão origem aos espermatozoides, por sofrerem alterações morfológicas, denominadas diferenciação celular, até

adquirirem a forma final do espermatozoide (Russel *et al.*, 1990). No testículo, o principal dano que EROs pode causar no espermatozoide é a compactação inadequada de cromatina, o que, conseqüentemente, aumenta a susceptibilidade desta célula ao estresse oxidativo, culminando com fragmentação de DNA (Kodama *et al.*, 1997; De Iuliis *et al.*, 2009).

Todos os animais tratados com o extrato apresentaram alteração na morfologia espermática e danos estruturais nas membranas acrossomal e espermática. A presença da patologia denominada de gota citoplasmática, principalmente observada em animais tratados diariamente com o extrato, torna o espermatozoide mais susceptível ao estresse oxidativo. A gota é um excesso de citoplasma residual que contém níveis elevados de enzimas que produzem EROs (Gomez *et al.*, 1996). Altos níveis de EROs danificam as membranas, podendo afetar a motilidade e a morfologia espermática (Zini *et al.*, 1998). Os danos de membrana e a intensa produção de EROs podem desencadear o processo de apoptose no espermatozoide, que envolve ativação de caspases, exteriorização de fosfatidilserina e danos de DNA espermático (Schuffner *et al.*, 2002; Muratori *et al.*, 2003). Todos esses fatores, juntos, podem afetar o potencial de fecundidade desta célula (Ergur *et al.*, 2002).

A alta produção de EROs observada nos epidídimos de animais tratados com BGE pode ter culminado com dano de DNA dos espermatozoides, visto a detecção de células espermáticas não-viáveis no lúmen. Nos animais tratados com citrato de sildenafil, BGE 100 e 200 mg/kg/d, os espermatozoides danificados foram retirados do lúmen epididimário por células epiteliais, a partir da ocorrência da autofagia identificada tanto por microscopia de epifluorescência quanto de luz. O mesmo aconteceu nos demais grupos experimentais, mas apenas no segmento inicial. A autofagia no epidídimo já foi descrita na literatura (Robaire *et al.*, 2015), sendo considerada de difícil detecção. Este processo deve ser eficiente quanto a retirada das células não viáveis, sem promover estresse oxidativo ou produção de citocinas pró-inflamatórias (Kurosaka *et al.*, 2003). Características histológicas da autofagia, como presença de grande número de vesículas e vacúolos de diferentes formas e tamanhos, além de numerosos corpos pálidos semelhantes a grandes vacúolos, foram vistos distribuídos em todos os níveis citoplasmáticos das células epiteliais epididimárias em gerbil (Domeniconi *et al.*, 2007). Na microscopia de luz, a área supranuclear pouco corada observada no presente trabalho corresponde a área de complexo de Golgi nas células principais (Domeniconi *et al.*, 2007). Já os vacúolos observados na porção basal

do epitélio da cauda do epidídimo sugerem a presença de fosfolipidose supranuclear e lipídios infranuclear no epitélio epididimário da cauda.

A autofagia levou à maior retirada de espermatozoides não viáveis do lúmen epididimário de animais tratados com BGE 400 mg/kg/d e BGE 200 mg/kg/3-3d. Sabe-se que, além de promover o estresse oxidativo, o composto majoritário presente no BGE pode induzir morte celular (Li *et al.*, 2016). Isto porque altas concentrações do composto 20 – hidroxiecdisona (20E) no extrato aumentam a concentração de cálcio intracelular e ativam a caspase 3. Esta, por sua vez, promove a morte celular por apoptose (Li *et al.*, 2016) por externalizar a fosfatidilserina, que é fundamental para o reconhecimento pelo epitélio da célula espermática danificada (Kurosaka *et al.*, 2003).

Dentre os tratamentos diários com BGE, animais que receberam 100mg/kg/d do extrato apresentaram alteração em todos os parâmetros espermáticos avaliados, que provavelmente influenciaram os altos percentuais de perdas embrionárias pré e pós implantação observados no presente trabalho. De fato, as alterações espermáticas levam a falhas de fertilização (Vernet *et al.*, 2004), evidenciando o efeito paterno no desenvolvimento embrionário, bem como na normalidade e bem-estar da prole (Wai-Sun *et al.*, 2006). As perdas pós-implantação caracterizaram-se, no presente trabalho, com a ocorrência de fetos mumificados e reabsorvidos. Podemos então sugerir que as perdas embrionárias estão associadas à baixa qualidade do espermatozoide e danos do seu DNA (Chen *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2015). Espermatozoides com DNA danificados são capazes de fertilizar ovócitos (O *et al.*, 1988), causando maior incidência de anormalidades estruturais em embriões implantados (Ying *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001). Apesar dos animais tratados com doses maiores terem apresentado espermatozoides com baixa viabilidade, estes não apresentaram perdas embrionárias significativas. Este fato deve-se à retirada eficiente dos mesmos pelo epitélio epididimário.

O BGE 100mg/kg/d atuou de forma similar a fármacos inibidores de fosfodiesterases, como o citrato de sildenafil, principalmente sobre perdas pós-implantação. Além disso, ambos os tratamentos atuaram similarmente sobre alterações em parâmetros de status oxidativo e espermáticos, exceto motilidade. Um estudo prévio já relatou o aumento da motilidade espermática com o uso do citrato de sildenafil, gerando ativação precoce das reações acrossômica (Glenn *et al.*, 2007). Além disso, inibidores de fosfodiesterases podem prejudicar tanto a pré e pós implantação como o

desenvolvimento embrionário (Lacham-Kaplan and Trounson, 1994; Scott and Smith, 1995) (Francis, 2005).

O uso em dias alternados (3-3d) do extrato apresentou resultados mais próximos aos encontrados no grupo controle. Porém, em relação à motilidade espermática, o efeito do extrato foi superior a qualquer um dos tratamentos testados. Machos desse grupo apresentaram o maior percentual de danos da integridade estrutural da membrana, o que pode ter influenciado os achados de motilidade. No entanto, quando na presença de espermatozoides com membranas íntegras, não se observou perdas em índices de fertilidade, como ao controle.

Pode-se concluir que o tratamento com o extrato de ginseng brasileiro causa alterações na viabilidade espermática, comprometendo o desenvolvimento embrionário pós implantação. A dose 100 mg/kg/d foi responsável pelos danos na fertilidade. Ela atuou de forma semelhante ao citrato de sildenafil sobre o espermatozoide, mostrando que ambas as substâncias têm um potencial deletério sobre sua viabilidade. O princípio de ação do extrato baseia-se na produção de EROs, culminando com danos de DNA. Maiores estudos devem ser conduzidos no intuito de investigar as condições do ambiente de produção espermática.

## **FUNÇÃO DOS AUTORES**

F.C.R. Dias: Preparação de amostras. Desenho experimental. Coleta e análise de dados. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final. G. D.A. Lima: Análise e interpretação de dados. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final; T.P. Menezes: Análise e interpretação de dados. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final; F.C.S.A. Melo: interpretação de dados. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final; M.Machado-Neves: interpretação de dados. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final; M.C. Cupertino: interpretação de dados. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final; W.C. Otoni: cultivo da planta in vitro. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final; S.L.P. Matta: Desenho, Análise e interpretação experimental. Elaboração do manuscrito e aprovação da versão final.

## **AGRADECIMENTO**

## FINANCIAMENTO

## CONFLITO DE INTERESSE

Nada a declarar

## REFERÊNCIAS

- Aebi H. Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods Enzymol* 1984; **105**:121–126.
- Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008; **1**:15–24.
- Aladakatti RH, Ahamed RN. Changes in sertoli cells of albino rats induced by *Azadirachta indica* A. Juss leaves R.H. Aladakatti and R. Nazeer Ahamed Department of Post-Graduate Studies & Research in Zoology. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2005a; **16**:67–80.
- Aladakatti RH, Ahamed RN. Ultrastructural changes in Leydig cells and cauda epididymal spermatozoa induced by *Azadirachta indica* leaves in albino rats. *Phyther Res* 2005b; **19**:756–766.
- Almeida SA, Kempinas WG, Lamano Carvalho TL. Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. *Brazilian J Med Biol Res* 2000; **33**:1105–1109.

- Barilli SLS, Montanari T. An experimental investigation on effect of the medicinal plant *Pfaffia glomerata*(Spreng.) Pedersen on gestation. *Reprod Clim* 2008; **23**:72–76.
- Borges CDS, Dias AFMG, Silva PV, Rosa JL, Guerra MT, Silva RF, Kiguti LRA, Pupo AS, Kempinas WDG. Long-term adverse effects on reproductive function in male rats exposed prenatally to the glucocorticoid betamethasone. *Toxicology* 2015; **19**:4–11. Elsevier Ireland Ltd.
- Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido Nítrico: Revisão. *Acta Cir Bras* 2002; **17**:417–423.
- Chen H, Cheung MPL, Chow PH, Cheung ALM, Liu W, O WS. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction* 2002; **124**:491–499.
- Chen HW, Jiang WS, Tzeng CR. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril* 2001; **75**:1163–1171.
- Dieterich S, Bieligk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation* 2000; **101**:33–39.
- Domeniconi RF, Orsi AM, Beu CCL, Felisbino SL. Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Tissue Cell* 2007; **39**:47–57.
- Eghbaliferiz S, Iranshahi M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phyther Res* 2016;1379–1391.
- Ergur AR, Dokras A, Giraldo JL, Habana A, Kovanci E, Huszar G. Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: Diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertil Steril* 2002; **77**:910–918.
- Fan Chung K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2006; **533**:110–117.
- Farombi EO, Adedara I a., Oyenihi AB, Ekakitie E, Kehinde S. Hepatic, testicular and spermatozoa antioxidant status in rats chronically treated with *Garcinia kolaseed*. *J Ethnopharmacol*2013; **146**:536–542. Elsevier.
- Fernandes GSA, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 2007; **23**:106–112.
- Francis SH. Phosphodiesterase 11 (PDE11): is it a player in human testicular function? *Int J Impot Res.* 2005; **17**:467–468.

- Freitas CS, Baggio CH, Silva-Santos JE Da, Rieck L, Moraes Santos CA de, Júnior CC, Ming LC, Garcia Cortez DA, Marques MCA. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata*(Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sci.* 2004;**74**:1167–1179.
- Gadelha ICN, Nascimento Rangel AH Do, Silva AR, Soto-Blanco B. Efeitos do gossipol na reprodução animal. *Acta Vet Bras* 2011; **5**:129–135.
- Garcia PV, Barbieri MF, Perobelli JE, Consonni SR, Mesquita SDFP, Kempinas WDG, Pereira LAV. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertil Steril* 2012; **97**:1444–1451.
- Garcimartína A, López-Olivab ME, González MP, Sánchez-Munizc FJ, Benedía.J. Hydrogen peroxide modifies both activity and isoforms of acetylcholinesterase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Redox Biol.* 2017; **12**:719–726. Elsevier B.V.
- Giri BR, Roy B. *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. *Parasitol Res.* 2016;2617–2624.
- Glenn DRJ, McVicar CM, McClure N, Lewis SEM. Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrosome reaction in vitro. *Fertil Steril* 2007; **87**:1064–1070.
- Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aiteken RJ. Development Retention Correlation of an Image Analysis of Residual Cytoplasm System by Human to Monitor Spermatozoa: the With Biochemical Markers of the Cytoplasmic Space, Oxidative Stress, and Sperm Function. *J Androl* 1996; **17**:276–287.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; **249**:7130–7140.
- Harrison R a, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990; **88**:343–352.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;51–88.
- Iuliis GN De, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress1. *Biol Reprod.* 2009;**81**:517–524.
- Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965; **27**:137.

- Kodama H, Kasai H, Yamaguchi R, Tanaka T, Fukuda J. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997; **68**:519–524.
- Kostic TS, Andric SA, Maric D, Kovacevic RZ. Inhibitory effects of stress-activated nitric oxide on antioxidant enzymes and testicular steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; **75**:299–306.
- Kumari A, Mojindra B, Gautam A, Verma Y, Kumar S. Reproductive toxic potential of panmasala in male Swiss albino mice. *Toxicol Ind Health* 2011; **27**:683–690.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol* 2003; **171**:4672–4679.
- Lacham-Kaplan O, Trounson AO. Embryo development capacity of oocytes fertilized by immature sperm and sperm treated with motility stimulants. *Reprod Fertil Dev* 1994; **6**:113–116.
- Li YB, Li XR, Yang T, Wang JX, Zhao XF. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes switching from autophagy to apoptosis by increasing intracellular calcium levels. *Insect Biochem Mol Biol* 2016; **79**:73–86. Elsevier Ltd.
- Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. 2002; Nova Odessa, SP.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Rabdall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Anal Biochem* 1951; **193**:265–275.
- Mahajan GK, Mahajan AY, Mahajan RT. Efficacy of aphrodisiac plants towards improvement in semen quality and motility in infertile males. *J Complement Integr Med* 2012; **9**(1):6.
- Matta APLF. Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*(Spreng.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos. 2012; Universidade Federal de Viçosa.
- McGarigal K. S. Cushman, and S. Stafford. 2000. *Multivariate Statistic for Wildlife and Ecology Research*. Springer. New York. 283 pp.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 2003; **24**:253–262.
- Nicoloso F, Fortunato R, Fogaça M. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata*(Spreng.) Pedersen em dois substratos. *Ciência Rural* 1999; **29**:277–281.

- Nicoloso FT, Erig AC, Martins CF, Russowski D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 2001; **2**:11-18.
- O WS, Chen Q, Chow PH. Effects of male accessory sex gland secretions on early embryonic development in the golden hamster. *J Reprod Fert* 1988; **84**:341–344.
- Oliveira, JM, Losano NF, Condessa SF, Freitas RMP, Cardoso AS, Freitas MB, Oliveira LL. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2018; **148** : 684–692
- Oshio LT, Ribeiro, C.C.T., Marques RM, M.O. G, Matta, S.L.P., Reis, J.E.P., Silveira e Sa, R.C., Campos, L.V., Peters VM. Effect of *Ginkgo biloba* extract on sperm quality, serum testosterone concentration and histometric analysis of testes from adult Wistar rats. *J Med Plants Res* 2015; **9**:122–131.
- Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 2002; **6**:178–185.
- Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist M-C. The Epididymis. In *Physiology Reproduction*. Knobil Neill's ED.p. 1071-1148, 2015
- Robb GW, Amman RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978;103–107.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Histopathology of the testis. In *Histological and histopathological evaluation of the testis* .Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED, editors. 1990, p. 210–266. Florida.
- Schuffner A, Morshedi M, Vaamonde D, Duran EH, Oehninger S. Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa. *J Androl* 2002; **23**:194–201.
- Scott L, Smith S. Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos. *Fertil Steril* 1995; **63**:2–11.
- Shepherd GJ. *Fitopac 2.1.2.85*. 2010;5.
- Silva Júnior, A.; Osaida CC. Ginseng-brasileiro - novo estímulo para o campo e para o corpo. *Agropecuária Catarinense* 2005; **18**:41–44.

- Silva MI, Ribas-filho JM, Malafaia O, Nassif PAN, Ribas M M, Varaschim M, Czezko LE. A utilização da *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva* 2010; **4**:228-233.
- Stedile R, Hollenbach CB, Mello FB De, Peixoto F, Bing R, Rosa PP, Silva LM, Vivian IF, Roberto J, Mello B De. Efeitos da associação de beta-glucana e itraconazol sobre a fertilidade de ratos Wistar machos. *Acta Sci Vet* 2013; **55**:1–8.
- Subramoniam A, Gangaprasad A, Sureshkumar PK, Radhika J, Arun BK. A novel aphrodisiac compound from an orchid that activates nitric oxide synthases. *Int J Impot Res* 2013; **25**:212–216.
- Teixeira CGL, Piccoli A, Costa P, Soares L, Silva-Santos JE da. Involvement of the nitric oxide/soluble guanylate cyclase pathway in the anti-oedematogenic action of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen in mice. *J Pharm Pharmacol* 2006; **58**:667–675.
- Ückert S, Oelke M, Stief CG, Andersson KE, Jonas U, Hedlund P. Immunohistochemical distribution of cAMP- and cGMP-phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human prostate. *Eur Urol* 2006; **49**:740–745.
- Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; **216**:31–39.
- Wai-Sun O, Chen H, Chow PH. Male genital tract antioxidant enzymes-Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **250**:80–83.
- Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem* 1993; **208**:10–15.
- Wong PS, Eiserich JP, Reddy S, Lopez CL, Cross CE, Van Der Vliet A. Inactivation of glutathione S-transferases by nitric oxide-derived oxidants: exploring a role for tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 2001; **394**:216–228.
- Ying Y, Cheung MPL, Chow PH, O WS. Effects of male accessory sex glands on sperm decondensation and oocyte activation during in vivo fertilization in golden hamsters. *Int J Androl* 1999; **22**:68–76.
- Zini A, O'Bryan MK, Israel L, Schlegel PN. Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: Correlation with sperm motility. *Urology* 1998; **51**:464–468.
- Zúccari C. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 1998; Universidade Estadual Paulista.



**Table 1:** Índices de fertilidade de camundongos Swiss machos tratados com extrato de ginseng brasileiro depois de acasalamento natural com fêmeas não tratadas.

Parameters	Control	Sildenafil citrate	BGE 100mg/kg/d	BGE 200mg/kg/d	BGE400mg/kg/d	BGE 200mg/kg/3-3d
Nº de fêmeas	8	8	8	8	8	8
Nº de fêmeas acasaladas	8	8	8	8	8	8
Nº de machos acasalados	4	4	4	4	4	4
Nº de machos que emprenharam fêmeas	3	3	3,5	3,5	4	3
Nº de fêmeas prenhes	6	5	6	6	6	6
Nº de corpos lúteos	13.00 ± 1.41 <sup>a</sup>	11.75 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.25 ± 1.26 <sup>a</sup>	9,75 ± 1,89 <sup>a</sup>	11,25 ± 2,06 <sup>a</sup>	13,00 ± 0,82 <sup>a</sup>
Peso do ovário (mg)	37.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	33.0 ± 4.0 <sup>a</sup>	34.0 ± 4.0 <sup>a</sup>	30,0 ± 9,0 <sup>a</sup>	38,0 ± 13,0 <sup>a</sup>	41,0 ± 6,0 <sup>a</sup>
Nº de Implantes	12.00 ± 2.12 <sup>a</sup>	12.25 ± 0.5 <sup>a</sup>	11.50 ± 0.58 <sup>a</sup>	11,50 ± 1,73 <sup>a</sup>	12,25 ± 1,5 <sup>a</sup>	13,75 ± 1,26 <sup>a</sup>
Nº de fetos viáveis	10.50 ± 2.17 <sup>a</sup>	9.83 ± 1.83 <sup>a</sup>	10.00 ± 2.16 <sup>a</sup>	10,50 ± 1,76 <sup>a</sup>	11,83 ± 3,37 <sup>a</sup>	12,83 ± 1,17 <sup>a</sup>
Peso fetal (g)	2.91 ± 2.05 <sup>a</sup>	2.55 ± 1.06 <sup>a</sup>	2.24 ± 1.00 <sup>a</sup>	3.39 ± 1.31 <sup>a</sup>	3.83 ± 1.25 <sup>a</sup>	3.60 ± 0.92 <sup>a</sup>
Índice de acasalamento feminino (%)	100	100	100	100	100	100
Índice de acasalamento masculino (%)	100	100	100	100	100	100
Índice de fertilidade do macho (%)	75	75	87,5	87,5	100	75
Taxa de prenhez (%)	71	63	75	75	71	67
Potencial de fertilidade (%)	65.28±50.67 <sup>a</sup>	79.96±49.90 <sup>a</sup>	82,15±33,66 <sup>a</sup>	100,20±44,89 <sup>a</sup>	84,44±54,20 <sup>a</sup>	70.65±54.82 <sup>a</sup>
Perda pré-implantação (%)	4.35±5.03 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	10.70±2.65 <sup>b</sup>	4.36±4.03 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
Perda pós-implantação (%)	7.82±0.99 <sup>a</sup>	26.85±8.98 <sup>b</sup>	23.61±8.56 <sup>b</sup>	12.85±7.55 <sup>a</sup>	12.69±3.10 <sup>a</sup>	6.69±0.27 <sup>a</sup>

Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. N = 4 machos/grupo. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

**Tabela 2:** Parâmetros de contagem espermática no testículo e epidídimo de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*

	Control	Sildenafil citrate	BGE 100mg/kg/d	BGE 200mg/kg/d	BGE 400mg/kg/d	BGE 200mg/kg/3-3d
Número de espermátide /t	20.73±0.32 <sup>a</sup>	6.38±0.76 <sup>b</sup>	6.91±0.78 <sup>b</sup>	7.51±1.62 <sup>b</sup>	4.50±0.26 <sup>c</sup>	6.19±0.76 <sup>b</sup>
Número de espermátide /gt	229.16±32.29 <sup>a</sup>	64.63±5.49 <sup>b</sup>	89.39±11.08 <sup>b</sup>	88.24±27.67 <sup>b</sup>	53.37±13.56 <sup>b</sup>	60.89±14.15 <sup>b</sup>
Produção espermática diária /t	4.28±0.067 <sup>a</sup>	1.32±0.157 <sup>b</sup>	1.43±0.16 <sup>b</sup>	1.55±0.33 <sup>b</sup>	0.93±0.054 <sup>c</sup>	1.28±0.16 <sup>b</sup>
Produção espermática diária /gt	42.01±4.56 <sup>a</sup>	12.37±1.21 <sup>b</sup>	14.34± 1.82 <sup>b</sup>	14.69±2.22 <sup>b</sup>	9.98±2.11 <sup>b</sup>	11.35±2.65 <sup>b</sup>
Número de espermatozoideCC/Org	10.30±1.71 <sup>a</sup>	2.82±0.62 <sup>b</sup>	3.98±1.08 <sup>b</sup>	3.99±0.82 <sup>b</sup>	3.08±1.11 <sup>b</sup>	5.03±1.53 <sup>b</sup>
Número de espermatozoide na C/gOrg	367.81±21.61 <sup>a</sup>	125.31±21.15 <sup>b</sup>	161.25±30.99 <sup>b</sup>	162.19±12.64 <sup>b</sup>	152.81±14.70 <sup>b</sup>	173.44±45.87 <sup>b</sup>
Tempo de trânsito CC (Dias)	2.40±0.36 <sup>a</sup>	2.16±0.50 <sup>a</sup>	2.77±0.54 <sup>a</sup>	2.67±0.86 <sup>a</sup>	3.33±1.25 <sup>a</sup>	3.87±0.81 <sup>a</sup>
Número de espermatozoide cauda/O	13.58±1.91 <sup>a</sup>	3.62±0.34 <sup>b</sup>	5.65±1.13 <sup>b</sup>	5.54±1.26 <sup>b</sup>	0.76±0.34 <sup>b</sup>	6.35±0.94 <sup>b</sup>
Número de espermatozoide cauda /gO	812.34±33.35 <sup>a</sup>	245.31±9.37 <sup>b</sup>	407.75±30.87 <sup>b</sup>	364.69±9.26 <sup>b</sup>	296.87±56.74 <sup>b</sup>	418.21±45.71 <sup>b</sup>
Tempo de trânsito na cauda(dias)	3.17±0.43 <sup>a</sup>	2.76±0.20 <sup>a</sup>	3.97±0.68 <sup>a</sup>	3.80±1.53 <sup>a</sup>	3.48±0.70 <sup>a</sup>	5.09±1.39 <sup>a</sup>

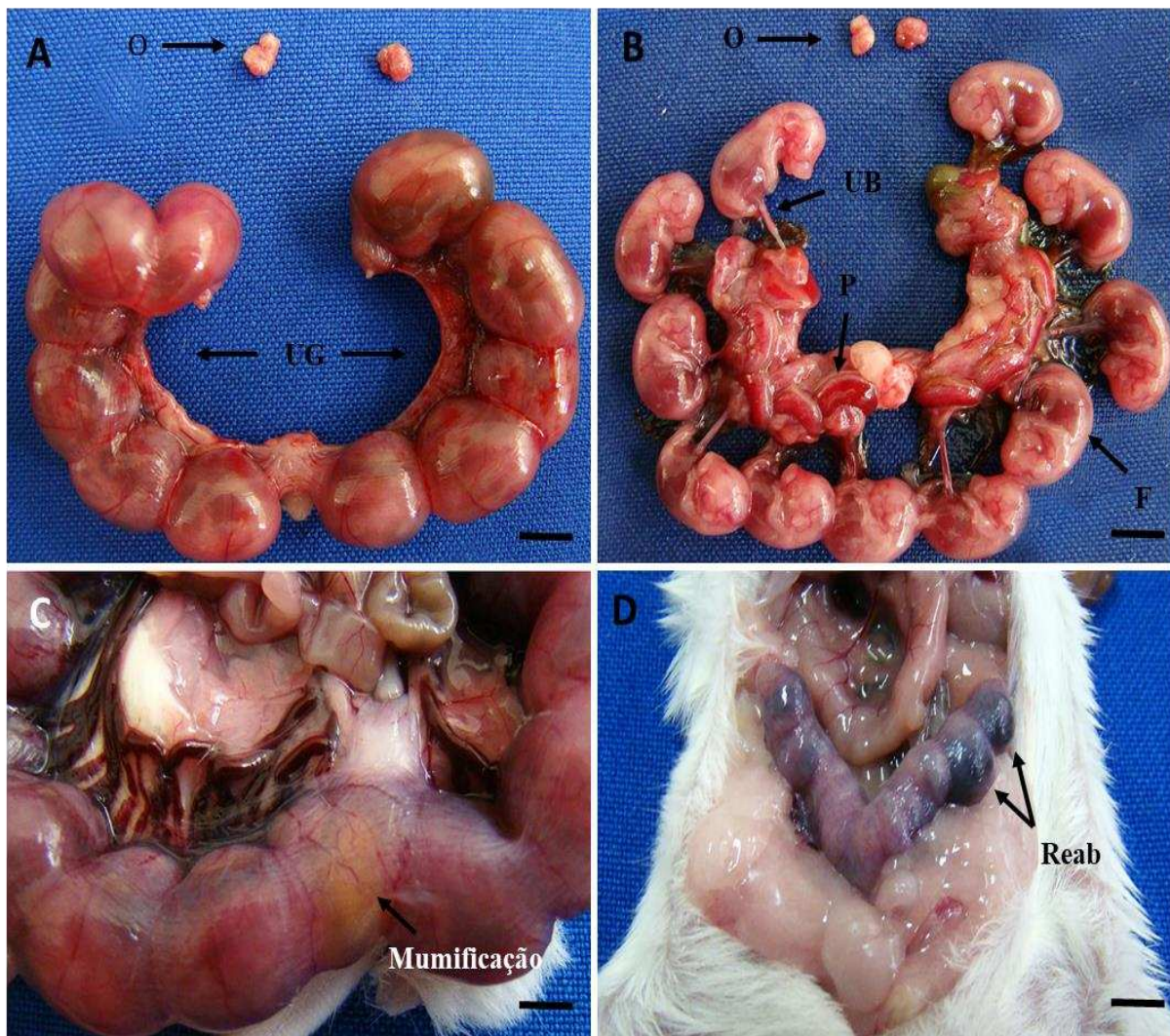
Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. N = 4 machos/grupo. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

**Tabela 3:** Morfologia e motilidade espermática de camundongos Swiss tratados com extrato hidro alcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*

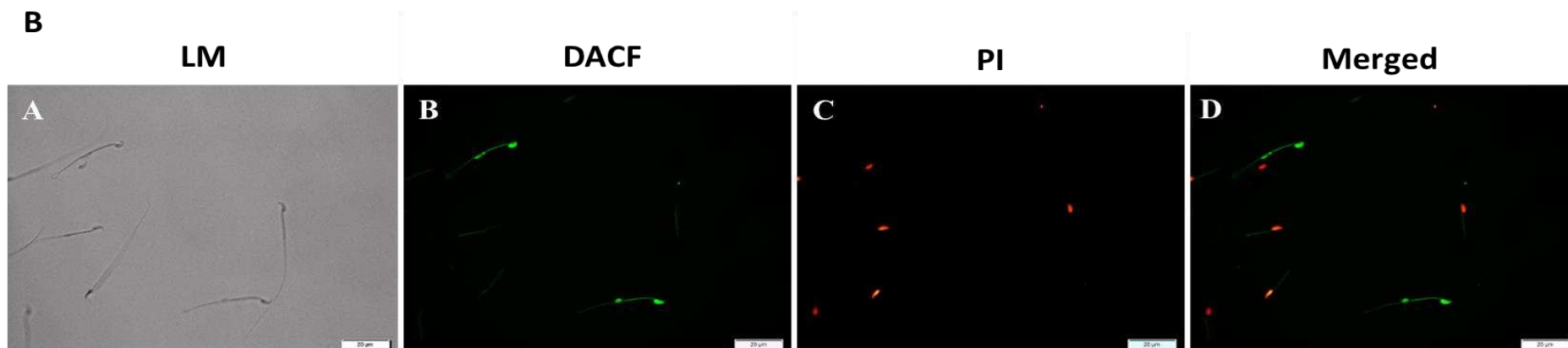
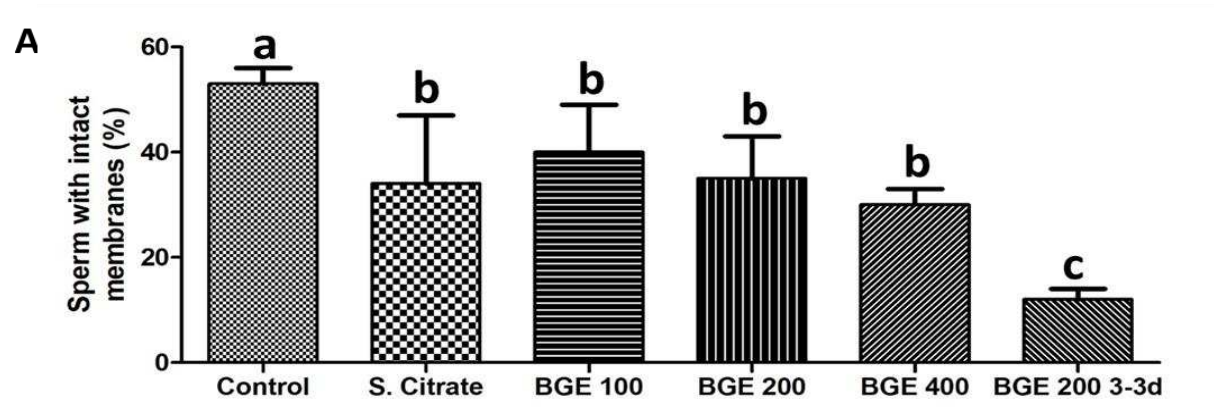
	Control	Sildenafil citrate	BGE 100mg/kg/d	BGE 200mg/kg/d	BGE 400mg/kg/d	BGE 200 mg/kg/3-3 d
Motilidade total (%)	66.67±9.12 <sup>a</sup>	86.67±18.92 <sup>b</sup>	48.33±19.74 <sup>c</sup>	66.67±9.57 <sup>ab</sup>	76.67±9.57 <sup>ab</sup>	0.00±0 <sup>d</sup>
Espermatozoide com morfologia normal (%)	70±3.46 <sup>a</sup>	42±8.88 <sup>b</sup>	28.33±10.00 <sup>b</sup>	44.33±12.34 <sup>b</sup>	38±5.29 <sup>b</sup>	57.33±5.03 <sup>b</sup>
Espermatozoide com morfologia anormal (%)	30±3.46 <sup>a</sup>	58±8.89 <sup>b</sup>	71.67±10.21 <sup>b</sup>	55.67±12.34 <sup>b</sup>	62±5.29 <sup>b</sup>	42.67±5.03 <sup>b</sup>
Defeito de peça intermediária	0.33± 0.58 <sup>a</sup>	3.33±1.53 <sup>a</sup>	4.33± 3.21 <sup>a</sup>	1.67± 1.53 <sup>a</sup>	3.00± 1.73 <sup>a</sup>	4.67± 3.06 <sup>a</sup>
Defeitos de cauda	8.0± 1.0 <sup>a</sup>	17.00±2.65 <sup>b</sup>	19.33±5.13 <sup>b</sup>	11.67±3.21 <sup>ab</sup>	12.00±2.00 <sup>ab</sup>	15.33±4.04 <sup>ab</sup>
Gota citoplasmática	21.67±4.16 <sup>a</sup>	37.67±7.09 <sup>a</sup>	48.00±10.15 <sup>b</sup>	42.33±12.50 <sup>b</sup>	47.00±3.00 <sup>b</sup>	22.67±7.77 <sup>a</sup>

Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. N = 4 machos/grupo. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

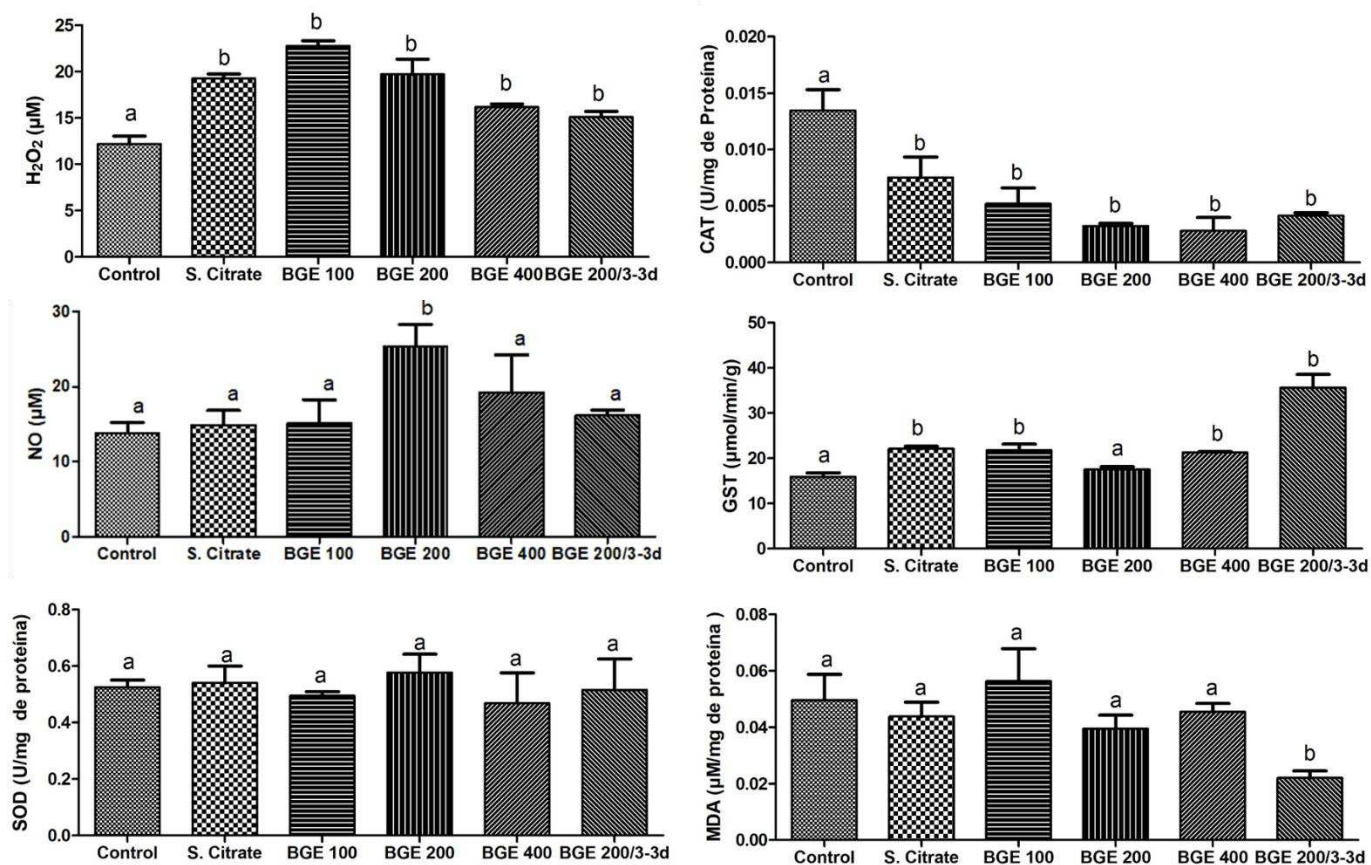




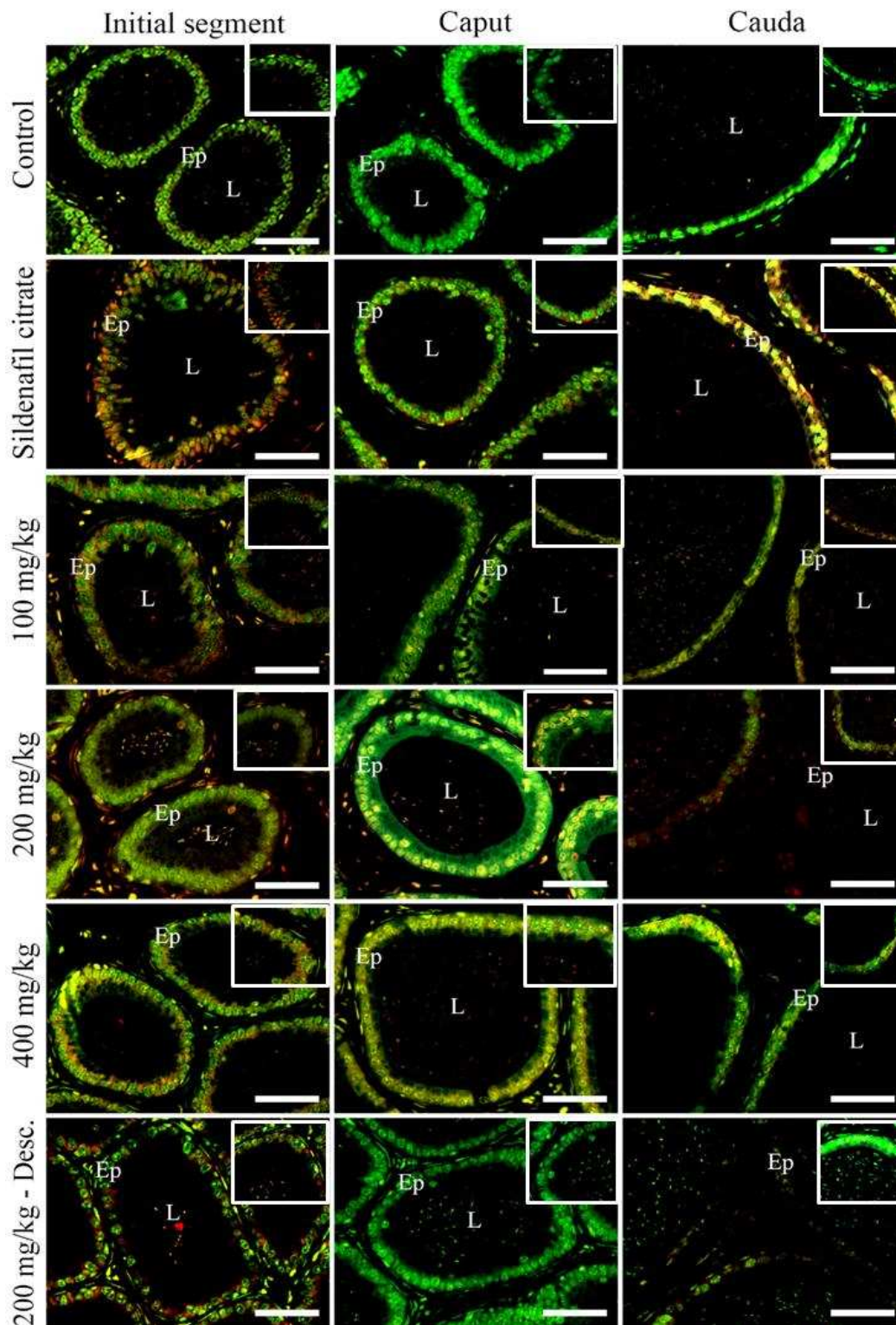
**Figura 1:** Fotos de úteros gestantes de camundongo fêmeas não tratadas e cruzadas com machos tratados com BGE em diferentes concentrações. A- útero gravídico (UG) com ovários (O) normais e útero gestante (UG); B- fetos (F) ligados pelo cordão umbilical (UB). Placenta (P) e os ovários (O); C- feto mumificado; D – útero gravídico com áreas de reabsorção (Reab) fetal.



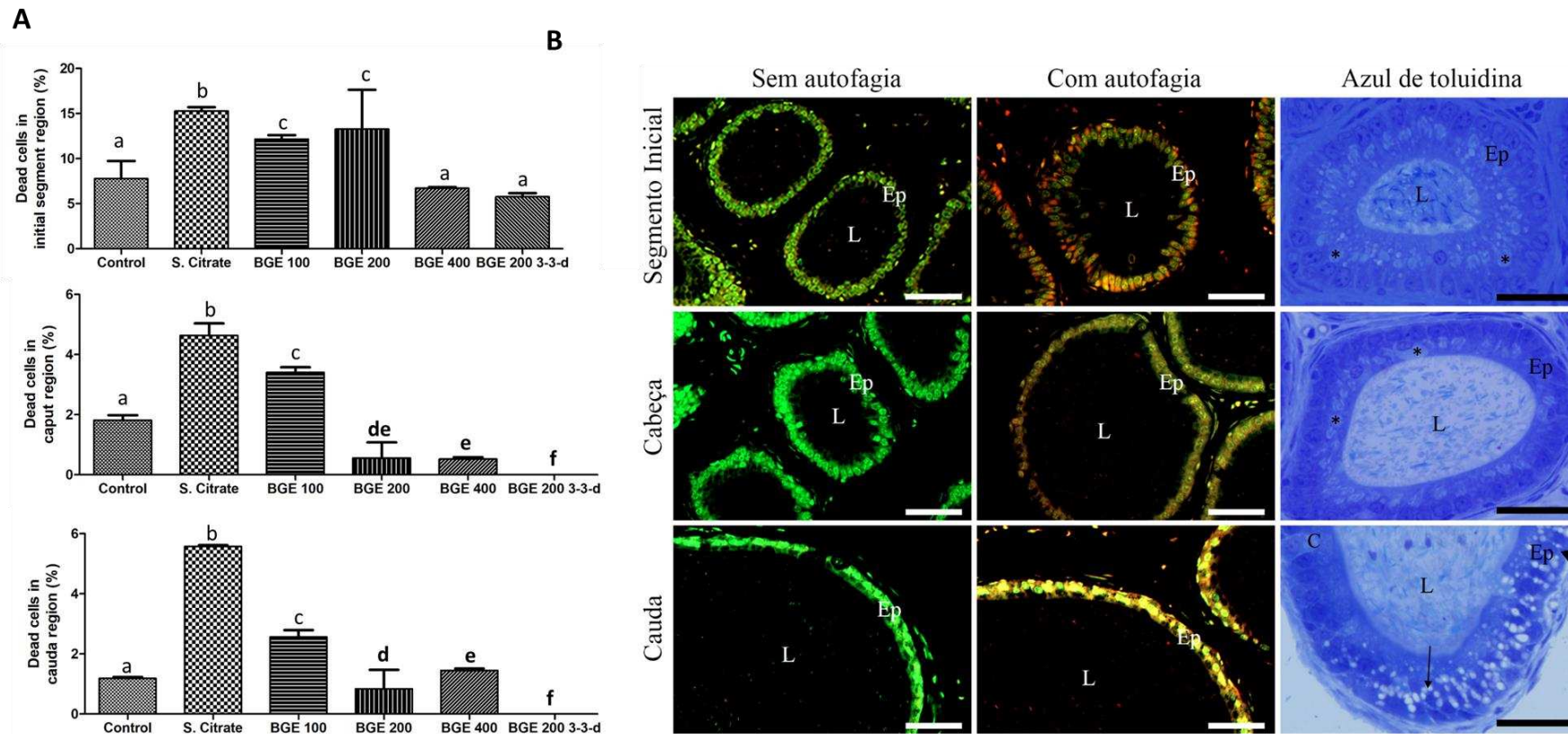
**Figura 2:**A. Percentual de espermatozoides com plasma intacto e membrana acrossômica marcada com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, Verde) de ratos expostos a extrato do Ginseng Brasileiro (N=4/grupo). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). O espermatozoide não intacto foi rotulado na cabeça com iodeto de propídio (PI, Vermelho). Média  $\pm$  SEM. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Newman Keuls. B. Representação da marcação dos espermatozoides com CFDA/PI. Barra = 20 $\mu$ m.



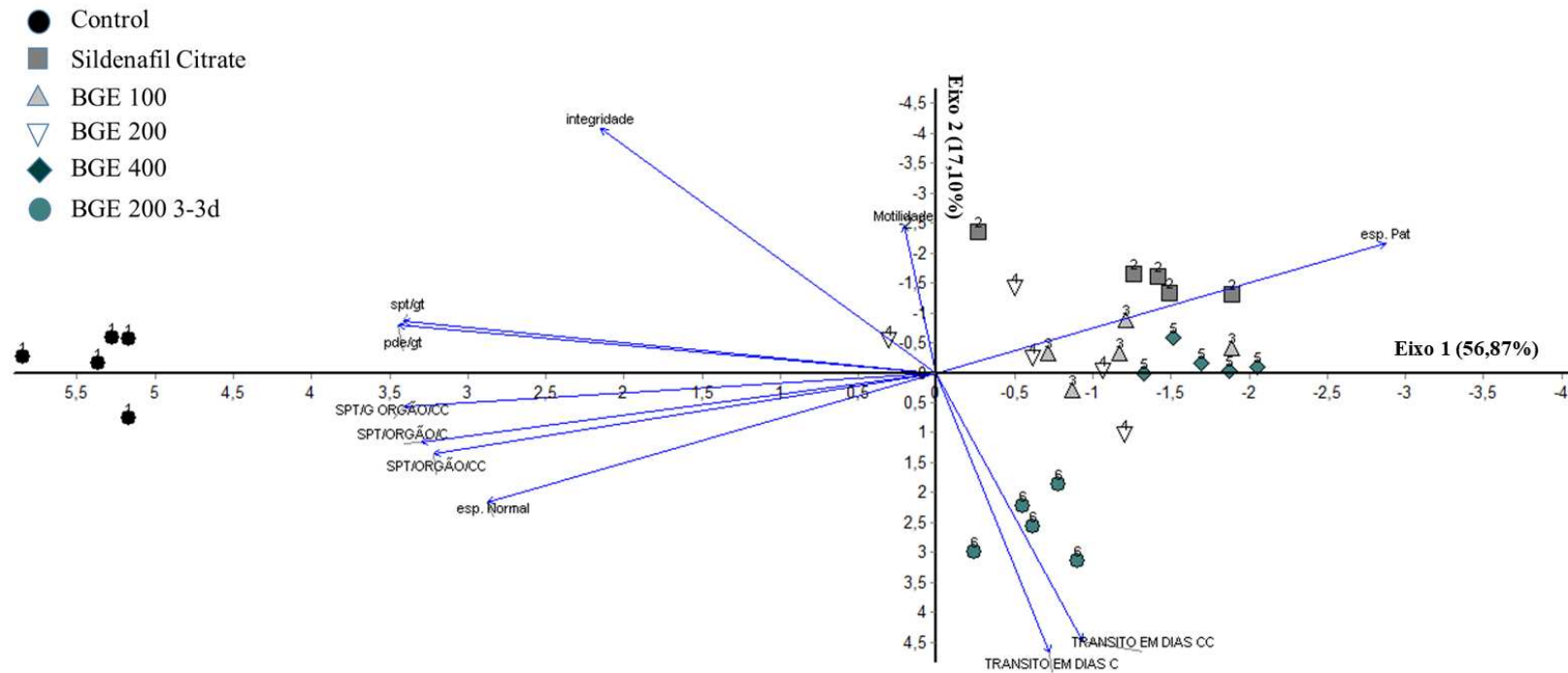
**Figura 3:**Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST) e metabólitos de peroxidação lipídica (MDA), estresse nitroso (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no epidídimo de camundongos Tratados com extrato de Ginseng Brasileiro.SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase, GST: Glutathione –S-transferase; MDA: Malondialdeído, NO: Óxido Nítrico. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Média ± SEM. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos (p <0,05) pelo teste de Newman Keuls.



**Figura 4:** Seções histológicas de segmento inicial, cabeça e cauda de epidídimo de camundongos tratados com Extrato de Ginseng Brasileiro (N=5/Grupo) analisados com microscopia de epifluorescência utilizando os corantes fluorocromos laranja acridina (AO, verde) e iodeto de propídio (PI, vermelho). As seções mostram células viáveis (verde) e apoptóticas células (laranja / vermelho). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d). L- Lume; Ep –Epitelio. Os detalhes na foto evidenciam os espermatozoides no lume. Barras: 50 µm.

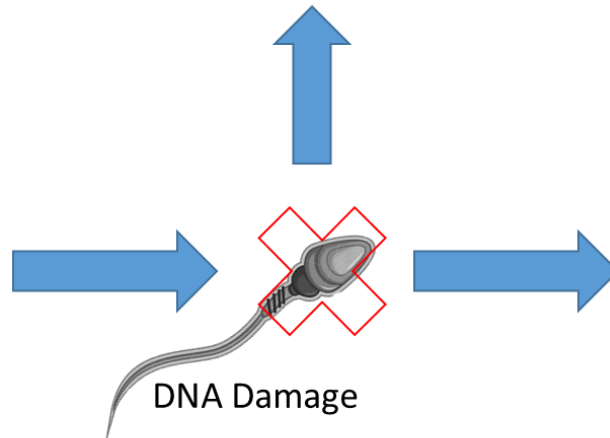
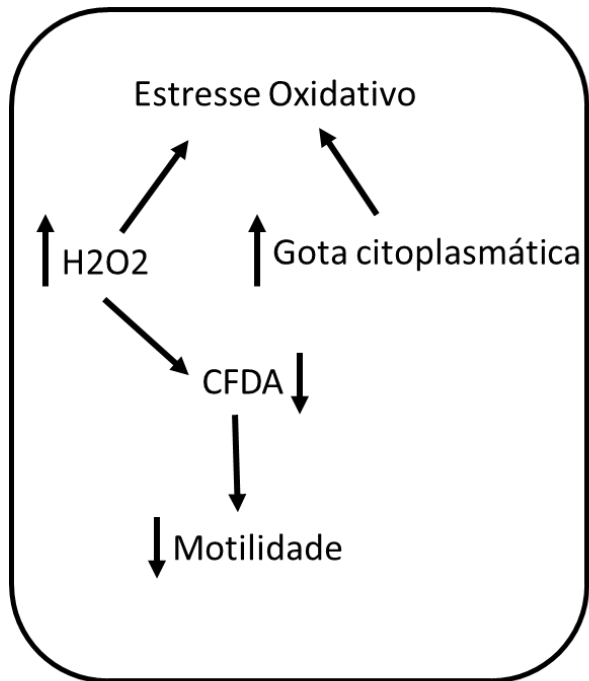


**Figura 5:**A – Quantificação de autofagia, células mortas no lume e interstício; B- Seções histológicas de epidídimo de camundongos (n = 5 / grupo) analisado sob microscopia de luz com coloração com azul de toluidina e microscopia de epifluorescência utilizando os corantes fluorocromos laranja acridina (AO, verde) e iodeto de propídio (PI, vermelho). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). L – Lume; Ep – Epitêlio; C- Células claras; Ponta de seta - Lipídios infranuclear; (\*) – Corpos pálidos; Seta – Vacúolos supranuclear. Barras de escala: azul de toluidina: 20  $\mu$ m; laranja acridina: 50  $\mu$ m.



**Figura 6:** Análise do componente principal (PCA) com base no conjunto de dados do estudo de animais Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d).

Confirmado pela técnica: Acridine Orange



- ✓ Perda pré e pós implantação
- ✓ Redução da PDE
- ✓ Redução de SPTZ no epidídimo
- ✓ Retirada de espermatozoides danificados

↓  
Autofagia

## **CAPITULO 2:**

**Hydroalcoholic extract of the root of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice's testes**

**Submetido a Revista Journal of Natural Products (ISSN – 0163-3864)**

**JOURNAL OF  
NATURAL  
PRODUCTS**

**O extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* altera a organização dos túbulos seminíferos modulando o estado oxidativo e a reestruturação microestrutural dos testículos dos camundongos**

Dias, F.C.R.; Matta, S.L.P. e Colaboradores

**ABSTRACT**

Leaves and roots of *Pfaffia glomerata* are used as aphrodisiacs, tranquilizers and antirheumatics. Due to the lack of experimental scientific data, studies are necessary to identify its medicinal properties. The present study aimed to evaluate the effect of the hydroalcoholic root extract of *P. glomerata* (Brazilian ginseng extract - BGE) on the testicular parenchyma, and evaluate possible harmful effects through testicular oxidative stress analysis. Adult mice were divided into 6 groups: control (water), sildenafil citrate, daily doses of BGE (100, 200 and 400mg/kg), and discontinuous (D) dose of BGE (200mg/kg every three days). The treatment reduced the proportion of seminiferous tubule and epithelium, epithelium height, number of Sertoli cells per gram of testis, and increased hydrogen peroxide levels, without affecting sperm production. It also promoted cell death and changes in the frequency of stages of the cycle of the seminiferous epithelium in some groups. The 100mg/kg dose responds in a similar way to sildenafil citrate, promoting changes in the gonadal structure, but with efficient response to contain the damage. Doses of 200mg/kg, continuous or discontinuous, induced increased testicular nitric oxide as well as sildenafil citrate group, showing be efficient as aphrodisiac, but promotes cell death regardless of the form of administration.

**Keywords:** Reproduction; Spermatogenesis; Toxicology; Phytotherapy

## INTRODUÇÃO

A demanda por medicamentos à base de plantas medicinais vem crescendo mundialmente <sup>1</sup> e a etnobotânica tem papel extremamente importante na busca por novos princípios ativos. Grande parte dos princípios ativos identificados em plantas foram determinados com base no seu uso popular.<sup>2,3</sup> A espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, popularmente conhecida como fáfia ou ginseng brasileiro, destaca-se dentre as plantas brasileiras com aplicação medicinal.<sup>4</sup> Ela pertence à família Amaranthaceae e encontra-se distribuída em toda América do Sul, desde as Guianas até Bolívia e Argentina. No Brasil ocorre principalmente no Paraná e Mato Grosso do Sul<sup>5</sup> ao longo de formações florestais e campestres.<sup>6</sup>

As plantas do gênero *Pfaffia* têm importância ornamental, alimentar e medicinal.<sup>7</sup> O interesse comercial por essa planta está associado principalmente às suas raízes tuberosas que são utilizadas na medicina popular como antirreumáticas, anti-inflamatórias e analgésicas.<sup>8</sup> As raízes são usadas também como afrodisíacas e estimulantes gerais,<sup>5</sup> tranquilizantes, antidiabéticas, febrífugas, cicatrizantes, anti-hemorroidais, além de atuarem positivamente na visão e na memória.<sup>9</sup> As raízes possuem em sua constituição fitoquímica ácido famérico, ácido glomérico, ácido oleanólico, ecdosterona, rubrosterona,  $\beta$ -Dglicopiranosil-oleanolato, fafianol A, fafiaglicosídeo e seus derivados,<sup>10</sup> sendo a ecdosterona seu composto majoritário.<sup>11</sup> Sua ação adaptógena está relacionada, principalmente, à presença da  $\beta$ -ecdisona,<sup>12</sup> que é utilizada como marcador químico da qualidade da planta.<sup>13</sup>

Orientações regulamentares mais rigorosas discorrem sobre a necessidade da realização de avaliações sensíveis e cuidadosas do trato reprodutivo masculino para potenciais efeitos tóxicos dos compostos administrados, mesmo os de origem vegetal, que podem levar à alterações da taxa de fertilidade masculina.<sup>14</sup> Um dos principais mecanismos pelos quais plantas e outros tóxicos podem desencadear lesões tissulares é através da desregulação do equilíbrio redox, levando a um quadro chamado estresse oxidativo. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou nitrogênio (ERNs) e as defesas antioxidantes celulares. Quando em baixas concentrações, as ROS funcionam como mediadores de ajustes celulares, sendo consideradas mensageiros secundários. Porém, quando estão em concentrações elevadas provocam injúrias celulares por meio de oxidação de proteínas, lipídeos e DNA, causando degeneração seguida de apoptose ou necrose.<sup>15</sup>

Ainda existe escassez de dados científicos sobre os efeitos, modo de uso e doses de diversas plantas ditas medicinais, incluindo *P. glomerata*. Dessa forma, é necessária a realização de estudos para avaliar a utilização de espécies vegetais baseada no conhecimento popular.<sup>16</sup> Portanto, neste estudo foram testadas diversas doses do extrato hidroalcoólico de *P. glomerata* e seus efeitos sobre o túbulo seminífero de camundongos Swiss adultos, considerando as células germinativas testiculares. Para isto foram realizadas análises biométricas, estereológicas e patológicas além de analisar estresse oxidativo testicular.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico da raiz do ginseng brasileiro (BGE) mostrou a presença de taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, triterpenos/esteróides e alcaloides (Tabela 1). Compostos da classe das antraquinonas não foram encontrados, diferente do observado no extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* encontrado por Matta<sup>9</sup> que não observou em seu extrato alcaloides, antraquinonas e cumarinas. Isto pode estar relacionado a diferenças no local e época de colheita da planta. A produção de metabólitos secundários pode variar dependendo das condições do ecossistema em que se encontram as espécies vegetais, níveis de radiação ultravioleta, composição atmosférica, herbivoria, ataque de patógenos, altitude, ritmo circadiano, sazonalidade, dentre outros.<sup>17</sup>

O fingerprint é um instrumento analítico importante para monitorar a qualidade das matérias primas de produtos fitoterápicos, o qual trouxe considerações relevantes quanto a composição química da raiz de *P. glomerata*. As condições cromatográficas aplicadas foram adequadas para a obtenção de cromatogramas que permitiram a visualização de um pico majoritário no extrato. A pureza do composto foi determinada após varredura do pico, mostrando que o comprimento de onda ideal para a leitura é 246nm (Figura 1), permitindo assim identificar o composto majoritário que é conhecido como 20-hidroxiecdisona (20E). Usando a curva padrão obtivemos a equação que permitiu quantificar o composto majoritário, sendo possível estabelecer a quantidade deste composto que foi ofertada diariamente para cada animal (100mg/kg = 20, 52 mg/kg/dia; 200mg/kg = 41, 05 mg/kg/dia; 400mg/kg = 82, 8 mg/kg/dia). O composto majoritário encontrado neste trabalho corrobora os dados da literatura que mostram que mesmo utilizando diferentes formas de extração e solventes, como metanol,<sup>11</sup> etanol 50%<sup>18</sup> ou 95%,<sup>9</sup> a 20E sempre é encontrada como composto majoritário. A 20E pode

ser utilizada como marcador químico da qualidade da matéria-prima (raízes) desta espécie.<sup>13,19</sup> Este composto pode ser utilizado Como agroquímico ou fitoterápico e pode estar envolvido em processos bioquímicos e fisiológicos de plantas e animais.<sup>20</sup> A ele é atribuída a ação adaptógena da planta.<sup>12,21</sup>

Geralmente, o efeito de xenobióticos começa com desequilíbrio redox, promovendo estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma resposta a este desequilíbrio, entre a capacidade antioxidante celular e a produção de espécies reativas (oxigênio e nitrogênio), levando a danos às macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA.

Os grupos que receberam *P. glomerata* apresentaram maiores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 2), indicando aumento da produção de ERO. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma molécula reativa extremamente deletéria à célula podendo atravessar camadas lipídicas e promover morte celular.<sup>22</sup> Outra espécie reativa capaz de promover morte celular é o óxido nítrico (NO). Apesar do NO participar de diversas vias de sinalização celular como mediador funcional, como no controle da esteroidogênese, o aumento exacerbado desse radical pode promover desequilíbrio redox levando ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à morte celular.<sup>23-26</sup> Assim, o efeito do NO depende da sua concentração, podendo ter função protetora em baixas concentrações<sup>26,27</sup> ou até provocar apoptose quando em níveis mais elevados. Neste trabalho foi observado aumento de NO nos grupos tratados com as doses BGE 100, 400 e 200mg/kg D quando comparado ao controle negativo (Figura 2). Portanto, o aumento nos níveis de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é indicativo de que o tratamento com *P. glomerata* aumenta a produção de EROs e pode causar estresse oxidativo e morte celular.

Neste estudo o tratamento com BGE causou redução de SOD nos grupos BGE 200, 400 e 200mg/kg D, além de aumento da CAT no grupo BGE 100mg/kg e da GST nos grupos BGE 100 e 200mg/kg D (Figura 2). A enzima antioxidante SOD tem o papel de catalisar a reação de conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio.<sup>28</sup> Os altos níveis de ERO podem causar redução das enzimas antioxidantes comprometendo sua síntese, como foi observado para a enzima SOD. A CAT realiza a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.<sup>29</sup> O aumento da atividade da enzima CAT pode ser explicado pelos maiores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos animais tratados. Entretanto, não foi observada atividade relevante desta enzima, exceto para o grupo que recebeu BGE 100mg/kg.

A glutathione S-transferase (GST) é responsável pela desintoxicação celular através de conjugados de glutathione com xenobióticos e produtos aldeídos produzidos na peroxidação lipídica, tornando-os mais solúveis em água.<sup>30</sup> Assim, a indução de GST é uma resposta das células ao estresse oxidativo, que foi observada nos grupos BGE 100 e 200mg/kg D (Figura 2). Nestes dois grupos, o aumento na atividade das enzimas GST pode ter evitado maiores danos causados pela peroxidação lipídica. Os baixos níveis de MDA nos grupos citrato de sildenafil, BGE 100, 200 e 200mg/kg D também podem ser explicados por outras vias de defesas não enzimáticas, como tocoferol, coenzima Q e vitamina C que não foram quantificadas nesse estudo.<sup>31</sup>

Embora o composto majoritário da *P. glomerata* (20 hidroxiecdisona) promova a apoptose,<sup>32</sup> o desequilíbrio redox é um dos mecanismos centrais pelo qual muitos desses estressores ambientais modulam ou desencadeiam apoptose, principalmente pela regulação de vias intrínsecas de apoptose ativada por mitocôndrias e danos ao DNA.<sup>33</sup> Estressores ambientais também induzem a ativação de respostas de sobrevivência, incluindo mecanismos de reparação do DNA e up-regulação de antioxidante. Estas são tentativas de defesa para neutralizar os efeitos deletérios que provocam morte celular. Assim, a morte celular ou a sobrevivência depende, na maioria dos casos, da intensidade e tipo de exposição.<sup>33</sup>

O dano celular e até a morte da célula foram comprovados nos animais tratados com as doses mais altas de *P. glomerata* como mostrado na figura 3. A marcação testicular com laranja de acridina e iodeto de propídio mostrou que os grupos Citrato de Sildenafil e BGE 100mg/kg possuíam células basais e espermátides arredondadas viáveis (marcadas em verde) e início de dano em DNA nas espermátides alongadas (marcadas em amarelo), com o grupo BGE 100mg/kg apresentou maior área de espermátides danificadas. Com as doses crescentes (BGE 100, 200 e 400mg/kg) esse dano levou à morte celular, de forma dependente da dose, onde a área de morte celular no grupo BGE 400mg/kg foi maior que o grupo BGE 200mg/kg. O grupo BGE 200mg/kgD apresentou a área de células mortas maior que o grupo 200mg/kg e menor que o grupo 400mg/kg, mostrando que alternar o tratamento pode potencializar os efeitos da dosagem. O fornecimento descontinuo do extrato pode ser responsável pela dificuldade de adaptação do organismo ao tratamento.

Antes de causar mudanças estruturais em um tecido, o tratamento causa danos funcionais. Os animais tratados com citrato de sildenafil e extrato brasileiro de ginseng 100mg / kg mostraram redução no número de espermátides alongadas / espermatozoides

no homogeneizado testicular. Também foi observado no fluido epididimário de animais tratados com alterações morfológicas e redução de espermatozoides com membrana intacta e aumento da motilidade espermática no grupo citrato de sildenafil. A avaliação do homogeneizado epididimário mostrou redução no número de espermatozoides, que levaram a perdas embrionárias (dados não publicados).

Em seguida ao dano celular ocorrem alterações histopatológicas no epitélio seminífero, que foram verificadas através do aumento da proporção de túbulos seminíferos patológicos (Figura 4). Os grupos BGE 100 e 200mg/kg apresentaram aumento de alterações leves (vacúolos na base do epitélio e no ápice), enquanto os grupos Citrato de Sildenafil e BGE 400mg/kg apresentaram maior número de túbulos com patologias moderadas (vacúolos no ápice e base, além de descamação de epitélio com presença de células no lúmen tubular). Características patológicas graves foram detectadas, porém em níveis não significativos (Figura4). Camundongos Balb/C que receberam extrato hidroalcoólico de *P. glomerata* mostraram grande percentual de túbulos com patologias severas,<sup>9</sup> relativamente maiores que o visto neste trabalho, revelando que as linhagens respondem de forma diferente ao mesmo tratamento ou dose.

O aumento de patologias observadas está relacionado ao efeito cumulativo do BGE administrado de forma contínua, tornando-se assim tóxico e resultando em degeneração do epitélio germinativo. Embora as células de Sertoli sejam muito sensíveis a danos químicos, elas respondem com alterações bioquímicas e não por morte celular, enquanto as células germinativas têm sua própria sensibilidade a diferentes substâncias químicas.<sup>34</sup> Alterações bioquímicas em células de Sertoli podem causar degeneração e o esgotamento de células germinativas em maior ou menor grau.<sup>35</sup> A esfoliação para o lúmen ocorre devido à perda de adesão entre a célula de Sertoli e a célula germinativa, com subsequente transporte das células para a *rete testis* e o epidídimo.<sup>36</sup> O mecanismo de ação da perturbação pode ser avaliado precocemente, mas com o período prolongado de tratamento e o avançar das alterações, perde-se o padrão e reduz a especificidade à medida que os túbulos ficam cada vez mais vazios de células germinativas.<sup>36</sup>

As patologias podem reduzir a capacidade das células de Sertoli em manter o arranjo das células germinativas e alterar a frequência de estádios,<sup>37</sup> sendo esta frequência essencial para estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero. O estadiamento para camundongo está bem definido na literatura,<sup>38</sup> e a frequência dos

estádios do CES encontra-se na tabela 2. O grupo BGE 100mg/kg apresentou redução da frequência do estágio I e os grupos BGE 100 e 200mg/kg D apresentaram aumento da frequência do estágio VII e redução da frequência do estágio VIII. Pode ter ocorrido paradaespermática neste estágio, comprometendo os estágios seguintes, tendo mais tempo de tratamento poderia ocorrer alterações nos próximos estágios do ciclo. Os tratamentos com drogas como a doxorubicina também alteraram a frequência de alguns estágios do epitélio seminífero.<sup>39</sup> Vale ressaltar que a perda maciça de células germinativas interfere na típica associação celular de cada estágio, alterando a sua frequência no ciclo do epitélio seminífero, podendo ser reestabelecida desde que ocorra a reorganização celular.<sup>40</sup> Assim, embora existam alterações na frequência elas aparentemente se compensam, mantendo o tempo da espermatogênese e, conseqüentemente, a produção e o rendimento espermático.

Os parâmetros biométricos e testiculares encontram-se na tabela 3. O peso corporal (PC) e o peso da albugínea testicular (PA) não foram alterados entre os grupos experimentais. Porém, o peso testicular (PT) aumentou nos grupos BGE 400 e 200mg/kg D em relação ao controle negativo. O peso do parênquima (PP) e os índices gonadossomático (IGS) e parenquimossomático (IPS) aumentaram no grupo BGE 200mg/kg D em relação ao controle. Embora doses altas de BGE tenham aumentado o peso testicular, nem todas as preparações com plantas alteram parâmetros biométricos como visto nos tratamentos com infusão de *Heteropterys aphrodisiaca*,<sup>41</sup> *Rudgea viburnoides*<sup>42</sup> e *Ginkgo biloba*<sup>43</sup> que não promoveram alteração nesses parâmetros. Por outro lado, animais que receberam infusão de *Tynnanthus fasciculatus* (cipó-cravo) também mostraram aumento no peso testicular quando tratados com a dose de BGE 200 mg/kg, sem alteração no peso corporal e no IGS.<sup>44</sup> O aumento do PT, do PP, do IGS e do IPS no grupo BGE 200mg/kg D pode estar relacionado a alterações na parte funcional do testículo (túbulo e intertúbulo), podendo ser explicada por hipertrofia compensatória.<sup>45-47</sup>

O percentual de túbulos seminíferos foi reduzido nos grupos citrato de sildenafil e BGE 100, 200 e 400mg/kg, e o percentual de epitélio reduziu em todos os grupos experimentais em relação ao controle negativo. Houve aumento do volume de túbulo em BGE 200mg/kg D, em relação ao controle, embora os volumes de epitélio e lúmen não tenham alterado entre os grupos. Por outro lado, o volume de túnica própria aumentou nos grupos BGE 200mg/kg e 400mg/kg em relação ao controle (Tabela 4). Diferente do encontrado neste trabalho, o percentual e volume de túbulo de animais

tratados com *Tynnanthus fasciculatus* aumentaram,<sup>44</sup> enquanto animais tratados com infusão de *Heteropterys aphrodisiaca* não alteraram o percentual de túbulo seminífero.<sup>41</sup> Os índices epiteliossomático e tubulossomático aumentaram no BGE 200mg/kg D em relação ao controle (Tabela 4). As doses contínuas tendem a reduzir os parâmetros tubulares, mas a dose descontínua tende a aumentar esses parâmetros o que pode ser devido a expansão das células germinativas.

O diâmetro de túbulo (DT) aumentou no grupo BGE 200mg/kg D e os BGE 100 e 200mg/kg D mostraram aumento no diâmetro de lúmen (DL) e redução na altura do epitélio (AE) (Tabela 5). O comprimento de túbulo por testículo não mudou, mas quando avaliado por grama de testículo reduziu no BGE 200mg/kg D em relação ao grupo controle (Tabela 5). A redução do comprimento tubular culminou em aumento do diâmetro tubular, justificado pelo aumento de lúmen e não um aumento de epitélio, refletindo numa manutenção da produção espermática. O tratamento com *Tynnanthus fasciculatus* promoveu aumento do CTS/t na dosagem de BGE 200 mg/kg, embora não tenha mostrado alterações no diâmetro e na altura do epitélio.<sup>44</sup> Em contrapartida, animais tratados com infusão de *Heteropterys aphrodisiaca*, apesar de não alterarem a altura do epitélio e o percentual de túbulo seminífero, mostraram redução do diâmetro de túbulo seminífero.<sup>41</sup> Segundo os autores, mostraram aumento do comprimento do túbulo seminífero por testículo como forma de compensação.<sup>41</sup>

A área de túbulo e a área de epitélio aumentaram em BGE 200mg/kg D, e os grupos BGE 100 e 200mg/kg D apresentaram aumento na área de lúmen e na relação túbulo epitélio (RTE) quando comparado ao grupo controle (Tabela 5). A redução na altura do epitélio no grupo BGE 200mg/kg D foi consequência da redução do comprimento do túbulo e do aumento do diâmetro tubular, das áreas de túbulo e lúmen, refletindo na RTE. O grupo BGE 100mg/kg também mostrou redução de altura e percentual de epitélio além da redução do percentual de túbulo, associado ao aumento da área do lúmen e aumento da RTE.

A população de células germinativas não variou significativamente após o período experimental (Tabela 6). No entanto o índice mitótico (IMI) reduziu no grupo BGE 200mg/kg D e o índice meiótico (IME) aumentou nos grupos citrato de sildenafil, BGE 100, 200 e 200mg/kg D em relação ao grupo controle, sendo esses índices um indicativo da eficiência das divisões. A redução de mitoses espermatogoniais e o aumento das meioses, justifica a manutenção do rendimento geral da espermatogênese. Essa redução mitótica mostra que o BGE está afetando as células da linhagem

espermatogênica, enquanto o incremento meiótico indica que a célula de Sertoli tenta suprir este dano, aumentando a capacidade de suporte. Porém, em animais tratados com infusão de *Heteropterys aphrodisiaca* o rendimento geral da espermatogênese aumentou por incremento de mitoses espermatogoniais.<sup>41</sup>

Parâmetros morfométricos de Sertoli como índice de célula de Sertoli (ICS), capacidade de suporte (CSS) e número de células de Sertoli por testículo (NCS/t) não foram alterados entre os grupos experimentais (Tabela 6). No entanto, observou-se redução significativa do número de células de Sertoli por grama de testículo, nos grupos BGE 100, 200, 400 e 200mg/kg D. As células remanescentes aumentaram a capacidade de suporte de forma a compensar a perda das células de Sertoli e assim garantir a eficiência do processo espermatogênico. Entende-se que a célula de Sertoli nunca trabalha no limite da sua capacidade de suporte, sendo possível ampliar ou reduzir sua eficiência dependendo da situação, o que pode ser observado pelo índice de célula de Sertoli, que foi maior nos grupos tratados embora não significativo. Com base nas análises morfométricas, embora tenha ocorrido hipertrofia compensatória levando à manutenção da produção espermática diária (PDE), as células produzidas não eram viáveis.

Diante do exposto os grupos experimentais seguem dois caminhos distintos: um que apresentou mecanismo de defesa eficiente e os que não tiveram eficiência nesse sistema. O grupo BGE 100mg/kg apresentou aumento de CAT e GST e manteve os níveis de SOD, além de baixos níveis dos marcadores de lesão de NO e MDA. Isto reletiu na baixa mortalidade apresentada por este grupo. Evidenciando a ativação da via de defesa em resposta ao estresse causado pelo tratamento, levando à manutenção das células viáveis no epitélio e apenas os espermatozoides em processo inicial de morte. Esta dosagem provavelmente causou menor interferência na capacidade antioxidante do órgão. Assim, as células testiculares foram capazes de responder aos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentando a atividade da CAT e protegendo-se contra maiores danos. Esses resultados podem ser suportados observando as extensas mudanças morfológicas mostradas entre os tratamentos. No entanto o grupo BGE100 obteve resposta semelhante aos animais tratados com citrato de sildenafil. Sabe-se que o tratamento crônico com citrato de sildenafil causa desorganização de túbulo seminífero, descamação de células com consequente aumento do lúmen e ausência de espermatozoides. Alguns túbulos mostraram bloqueio espermático no espermatócito primário, causando danos testiculares progressivos associados à esta situação.<sup>48</sup>

A alta produção de ERO durante um longo período pode diminuir a capacidade da célula em responder a agressores, como xenobióticos.<sup>49</sup> Assim os grupos com doses maiores não mostraram evidências de que o organismo está tentando reverter o quadro de agressão. O sistema antioxidante ineficiente e com danos maiores, levou à morte as células germinativas (espermátócito primário em preleptóteno e paquíteno, espermátide arredondada, além de espermatozoides). Esta morte posteriormente causou perda acentuada de células e alterações na estrutura tecidual que mostrou quadro de patologia leve.

Em conclusão, o tratamento com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*, quando administrado em doses baixas respondem de forma semelhante ao Citrato de sildenafil. Embora seja usado como afrodisíaco, promove alterações estruturais tubulares e causa estresse oxidativo testicular. Na dose de 100 mg/kg, alterações na estrutura gonadal, porém com resposta eficiente para conter o dano. As doses de 200mg/kg, contínua ou descontínua, aumentam o óxido nítrico testicular e peróxido de hidrogênio mostrando que podem ser eficientes como afrodisíaco, porém promovem morte celular independente da forma de administração. Sugere-se que nas maiores doses a morte celular pode ser desencadeada pelo próprio composto majoritário 20E, ou pelo aumento do NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ambos descritos como promotores de danos a espermatozoides e morte celular, uma vez que não houve aumento de MDA.

## SECCÃO EXPERIMENTAL

### Procedimentos experimentais gerais

**Material vegetal-**A matriz de *P. glomerata* (AC22) 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, Brasil, e cultivada em estufas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. As plantas usadas neste experimento foram provenientes do banco de germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFV (LCT – Bioagro – UFV), sendo cultivadas em Vila Valério, Espírito Santo, Brasil (18°58'55.5"S 40°15'17.8"W) e coletadas em novembro de 2015. As amostras foram coletadas ao completar 1 ano de plantio, secas em estufa a 55°C e trituradas em moinho de facas (SL32, Solab). Um

espécime testemunho foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger - CESJ-UFJF, Minas Gerais, Brasil (CESJ- 63317).

**Extração e Prospecção Fitoquímica** - O extrato foi obtido a partir da raiz triturada, deixada em maceração por 48h em álcool etílico 95% e, em seguida, submetida à percolação exaustiva com o mesmo solvente (rendimento de 9,3%). Para prospecção o extrato foi ressuspendido em metanol e depositado em cromatofolhas de alumínio com o auxílio de capilares de vidro. A prospecção fitoquímica foi realizada para as classes de compostos alcaloide, antraquinonas, cumarinas, triterpenos/esteroides, flavonoides, saponinas e taninos. Todos os solventes P.A. utilizados para compor os sistemas de fases móveis utilizados na foram das marcas Vetec®, ECIBRA®, ISOFAR®, NEON® e Êxodo®.

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

As separações foram realizadas em sistema HPLC pelo injetor de amostra automática. A coluna utilizada nas eluções (Shimpack®, 15cm por 4.6mm) foi fase reversa (C-18), mantida a 30 °C foi utilizada na análise cromatográfica. A separação foi realizada em um sistema de gradiente, utilizando como fase móvel uma mistura de metanol: água. No tempo de 0 a 5 min, a concentração de metanol: água variou de 10:90 (v / v) a 70:30 (v / v). No tempo de 5 a 12 minutos, a concentração de metanol: água permaneceu às 70:30 (v / v), e no tempo de 12 a 15 min, a concentração de metanol: água variou de 70:30 (v / v) a 100 % de metanol. O comprimento de onda de detecção foi de 245 nm e taxa de fluxo de 1 mL / min, com uma duração de 15 min. As condições foram previamente testadas e otimizadas. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL.

Para a quantificação do composto majoritário fez-se uma curva padrão da 20-hidroxiecdisona, com padrão de 99% de pureza de β-ecdisona (Sigma Chem. Co. EUA). As corridas apresentaram as mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente, porém em diferentes concentrações (24, 60, 120,180, 230 e 290 ppm). Em seguida

gerou-se um gráfico linear e obteve-se a equação da curva e, através dela, calculou-se a concentração do composto majoritário no extrato.

**Animais experimentais-** Todos os procedimentos experimentais seguiram os padrões determinados pelo CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, sendo aprovado pela CEUA – UFV (Comissão de Ética em uso de animais) da Universidade Federal de Viçosa sob o protocolo N°44/2015.

Trinta e seis camundongos Swiss machos (40g; 55 dias) foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=10/ grupo). Animais controles receberam 0,5 mL de água (G1; controle negativo) e citrato de sildenafil receberam 7 mg/kg em 0,5 mL de água (G2; controle positivo) por gavagem. Já os animais tratados diariamente com o BGE foram distribuídos em grupos que receberam 100 mg/kg (G3), 200 mg/kg (G4), 400 mg/kg (G5). Animais do último grupo (G6) receberam BGE 200 mg/kg (3-3 dias). As concentrações do extrato foram ressuspensas em 0,5 mL de água e administradas via gavagem. Essas doses foram escolhidas baseadas em estudos prévios com a planta (Matta, 2012). Utilizou-se o citrato de sildenafil como controle positivo por ele ser um inibidor potente e seletivo da PDE5.

O tratamento com BGE teve duração de 42 dias consecutivos em todos os grupos experimentais, considerando o tempo de duração do ciclo do epitélio seminífero no camundongo<sup>50</sup>. Com exceção de G6 receberam BGE a cada 3 dias neste período, totalizando 14 doses. O experimento foi conduzido sob temperatura controlada (22 + 2 °C), umidade (60-70 %) e fotoperíodo (12-12h luz / escuro), e os animais tiveram acesso a alimentos e água *ad libitum*.

**Coleta do material e microscopia de luz-** Após 24h do término do período experimental, os animais foram anestesiados com tiopental intraperitoneal (30mg/kg) e o sangue foi retirado por punção cardíaca. Os testículos foram removidos, dissecados e pesados, sendo o testículo esquerdo fixado em Karnovsky<sup>51</sup> e destinado para avaliação histomorfométrica e patológica e o testículo direito congelado para análises de estresse oxidativo.

O material destinado à histologia foi desidratado em série crescente de etanol e incluído em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 3 µm foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de no mínimo 40 µm entre

os cortes. As preparações histológicas foram coradas com azul de toluidina + borato de sódio (1%). Para as análises morfométricas foram utilizadas imagens digitais obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). Todas as imagens foram analisadas utilizando o software Image J® (National Institute of Health, USA).

**Biometria corporal e testicular-** Os testículos foram pesados em balança de precisão (BEL Mark 160/0.0001g). Para determinar o peso do parênquima testicular a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular foi calculado o índice gonadossomático (IGS, %) a partir da divisão do peso testicular pelo peso corporal e multiplicado por 100<sup>52</sup>. O índice parenquimossomático (IPS, %) foi determinado pela divisão do peso do parênquima testicular pelo peso corporal e multiplicado por 100.

**Morfometria** - A proporção volumétrica de túbulos seminíferos foi estimada a partir da contagem de 266 pontos em 10 campos aleatórios, totalizando 2.660 pontos para cada animal. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado por cada constituinte multiplicado pelo volume do parênquima testicular. Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1,<sup>53</sup> a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume.

O índice tubulossomático (ITS) foi calculado dividindo-se o volume de túbulo seminífero pelo peso corporal x 100. O índice epiteliossomático (IES) foi obtido pela divisão do volume do epitélio seminífero dividido pelo peso corporal multiplicado por 100.

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, sem considerar a fase do ciclo do epitélio seminífero. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero (média de duas medidas diametralmente opostas).

Foram calculadas as áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE), de acordo com as fórmulas:  $ART = \pi.RT^2$ , onde RT= raio tubular;  $ARL = \pi.rT^2$ , onde rT= raio luminal;  $ArE = ArT - ArLU$  e a Relação T/E=  $ArT - ArE$ .

O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular

médio obtido para cada animal.<sup>54</sup> O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula:  $CTS/g = \text{Comprimento total de túbulos} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$ .

**Contagem de célula germinativa** - 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,<sup>55</sup> foi feita a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Foram utilizadas 20 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.<sup>56</sup> Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celulares estudados, para cada animal. 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 usada para quantificar as células germinativas.<sup>56</sup>

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, 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: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:SGA); rendimento geral da espermatogênese (EAR: SGA); índice meiótico (EAR:PAQ); índice de célula de Sertoli (EAR: SER); capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL/L + PAQ + EAR:SER).

O número de células de Sertoli foi estimado usando 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:  $NCS = \text{Comprimento total de túbulos seminíferos } (\mu\text{m}) \times \text{Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal} / \text{Espessura do corte } (\mu\text{m})$ . A partir desse cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

A produção espermática diária (PED), foi calculada segundo Amann e Almquist<sup>57</sup> de acordo com a fórmula:  $PED = \text{Volume total do túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times$

Número corrigido de espermátides arredondadas / Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias) x Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}^2$ ) x espessura do corte histológico ( $\mu\text{m}$ ). Os valores por grama de testículo, foram estimada dividindo a PDE pelo peso testicular.

A frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi determinada a partir da caracterização e contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal, escolhidos aleatoriamente. Os estádios foram caracterizados pelo método da morfologia tubular.<sup>58</sup>

**Histopatologia** - Para se estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos, foram contados 200 túbulos, em campos aleatórios, nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram considerados túbulos com patologias aqueles que apresentavam alteração morfológica.<sup>35,59,60</sup> De acordo com Johnsen existem 10 níveis de alterações, que são expressos em números. Neste trabalho foi usado o escore de Johnsen<sup>61</sup> modificado para 8 níveis: **Nível 1**- túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; **Nível 2**- espaços vacuolares na base do epitélio; **Nível 3**- espaços vacuolares no ápice do epitélio; **Nível 4**- espaços vacuolares na base e no ápice do epitélio; **Nível 5**- células espermatogênicas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração visível ; **Nível 6**- túbulos apenas células basais; **Nível 7**- túbulos apenas células de Sertoli; **Nível 8**- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas, caracterizando um estado irreversível de degeneração. Estes níveis foram agrupados em normal (nível 1), leve (Níveis 2 e 3), moderado (Níveis 4 e 5) e severo (Níveis 6,7 e 8).

**Viabilidade de Célula Germinativa** -As secções histológicas do tecido testicular de 1 $\mu\text{m}$  foram coradas com corante duplo de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) para avaliação das alterações morfológicas da apoptose celular e porcentagem de células mortas.<sup>62</sup> As imagens digitais foram capturadas pelo fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá). O laranja de acridina marca as células danificadas e vivas, enquanto o IP marca apenas as células que perderam a integridade da membrana, pois não pode atravessar uma membrana plasmática intacta. Os critérios morfológicos utilizados para a classificação de células saudáveis e mortas foram os seguintes: células viáveis mostraram núcleo verde e as

células mortas exibiram núcleo vermelho denso.<sup>62-64</sup> As imagens digitalizadas foram enviadas para o programa Image J e as áreas reveladas com a dupla marcação laranja de acridina/iodeto de propídio foram selecionadas por meio da distribuição de cor como parâmetro discriminante. Após a definição do intervalo de cor por meio de tentativa e erro foi selecionada a área em que representa a quantidade de células em processo inicial de dano (amarelo/alaranjado) ou células mortas (vermelho) em cada campo. Em seguida, foi realizada no próprio programa Image J a máscara que oferece a área e o percentual das células germinativa ou espermatozoides danificados ou mortos em cada campo da imagem. Foi usada a técnica da Histofotometria Computadorizada.<sup>65</sup> Foi quantificada uma área total de  $30 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  para cada grupo.

**Estresse oxidativo** -O testículo foi obtido, pesado imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^\circ \text{C}$  até o uso. As amostras foram homogeneizadas em tampão de fosfato de potássio (pH 7,4, 0,2M), contendo EDTA 1M, utilizando um homogeneizador (OMNI) e centrifugadas (13,800 g a  $4^\circ \text{C}$  durante 10 min). O sobrenadante foi utilizado para a seguinte análise: enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST); concentração de óxido nítrico (NO); marcador de estresse oxidativo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); Malondialdeído (MDA) e níveis de proteína total. Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas por duplicado usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito/ nitrato pela reação de Griess padrão.<sup>66</sup> A produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada segundo Oliveira.<sup>67</sup> A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mensurada através do protocolo de Siddiqui *et al*<sup>68</sup> A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela taxa de queda da absorbância, em 60 segundos, do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>69</sup> e a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).<sup>24</sup> Os níveis de malondialdeído (MDA) que é o resultado da peroxidação lipídica, foram determinados utilizando-se solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO).<sup>70</sup> A

concentração de proteína total das amostras foi mensurada utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão.<sup>71</sup> e utilizada para homogeneização dos dados de estresse.

**Estatística** - Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de  $p \leq 0,05$ . Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## REFERÊNCIAS

- (1) Freitas, C. S.; Baggio, C. H.; Da Silva-Santos, J. E.; Rieck, L.; Santos, C. A. D. M.; Júnior, C. C.; Ming, L. C.; Cortez, D. A. G.; Marques, M. C. A. *Life Sci.* **2004**, 74 (9), 1167–1179.
- (2) Gurib-Fakim, A. *Mol. Aspects Med.* **2006**, 27 (1), 1–93.
- (3) Manzali de Sá, I. *Rev. Ciências Agroveterinárias* **2006**, 5, 3–8.
- (4) Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas*; Nova Odessa, SP, **2002**.
- (5) Teske, M.; Trentini, A. M. *In Herbarium Laboratório botânico*; Curitiba, **2001**; p 317.
- (6) Guerreiro, C. P. V.; Marques, M. O. M.; Ferracini, V. L.; Queiroz, S. C. N.; Ming, L. C. *Rev. Bras. Plantas Med.* **2009**, 11 (4), 392–398.
- (7) Silva Júnior, A.; Osaida, C. C. *Agropecuária Catarinense* **2005**, 18 (2), 41–44.
- (8) Nicoloso, F.; Fortunato, R.; Fogaça, M. *Ciência Rural* **1999**, 29 (2), 277–281.
- (9) Matta, A. P. D. L. F. *Efeito do extrato hidroalcoólico da raiz de Pfaffia glomerata (SPRENG.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos adultos*. Universidade Federal de Viçosa, **2012**.
- (10) Nakamura, S.; Chen, G.; Nakashima, S.; Matsuda, H.; Pei, Y.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2010**, 58 (5), 690–695.
- (11) Corrêa, J. P. O.; Vital, C. E.; Pinheiro, M. V. M.; Batista, D. S.; Azevedo, J. F. L.; Saldanha, C. W.; da Cruz, A. C. F.; DaMatta, F. M.; Otoni, W. C. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2015**, 121 (2), 289–300.
- (12) Vigo, C. L. S.; Narita, E.; Marques, L. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, 13, 46–49.
- (13) Zimmer, A. R.; Bruxel, F.; Bassani, V. L.; Gosmann, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40 (2), 450–453.
- (14) Creasy, D. M. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* **2003**, 68 (5), 408–415.
- (15) Ribeiro, S.M.R.; Queiroz, J.H.; Peluzio, M.C.G.; Costa, N.M.B.; Matta, S.L.P.; Queiroz, M.E.L.R. *Biosci. J.* **2005**, 21 (3), 133–149.
- (16) Chauhan, N. S.; Sharma, V.; Dixit, V. K.; Thakur, M. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014.
- (17) Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. *Quim. Nova* **2007**, 30 (2), 374–381.

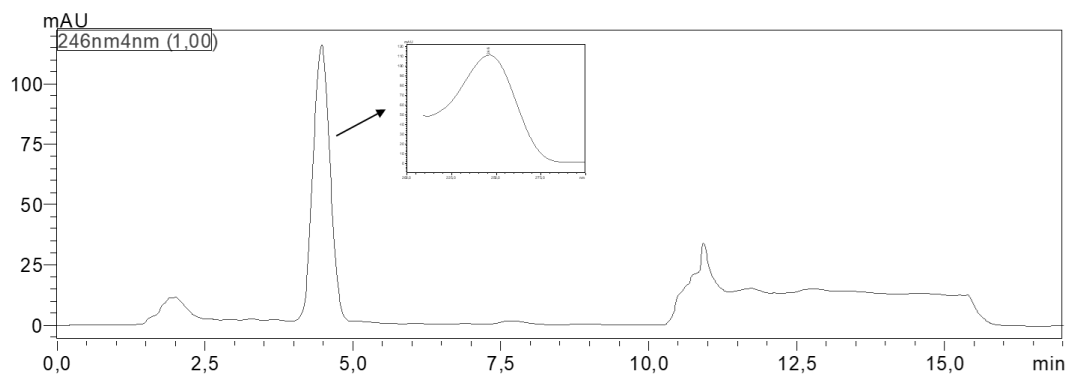
- (18) Carneiro, M. I. S.; O.; Ribas Filho, C. A. P. M.; Malafaia, O.; Ribas, C. A. P. M.; Santos, C. A. M.; Cavalcanti, T. C. S.; Czczeko, L. E. A. *Arq. Bras. Cir. Dig.* **2010**, 23 (3), 163–167.
- (19) Magalhães, P. M. In *Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas*; Santafé de Bogotá, **2000**; pp 323–332.
- (20) Festucci-Buselli, R. a.; Contim, L. a. S.; Barbosa, L. C. a.; Stuart, J.; Otoni, W. *C. Botany* **2008**, 86 (9), 978–987.
- (21) Figueiredo, L. S. *Rev. Bras. Plantas Med.* **2004**, 7 (1), 67–72.
- (22) Garcimartína, A.; López-Olivab, M. E.; González, M. P.; Sánchez-Munizc, F. J.; Benedía. *J. Redox Biol.* **2017**, 12 (February), 719–726.
- (23) Dusse, L. M. S.; Vieira, L. M.; Carvalho, M. G. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **2003**, 39, 343–350.
- (24) Pasqualotto, F. F.; Sharma, R. K.; Nelson, D. R.; Thomas, A. J.; Agarwal, A. *Fertil. Steril.* **2000**, 73 (3), 459–464.
- (25) Lee, M.-H.; Jang, M.-H.; Kim, E.-K.; Han, S.-W.; Cho, S.-Y.; Kim, C.-J. *J. Pharmacol. Sci.* **2005**, 97 (3), 369–376.
- (26) Tripathi, P.; Tripathi, P.; Kashyap, L.; Singh, V. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2007**, 51 (3), 443–452.
- (27) Yoshioka, Y.; Yamamuro, a; Maeda, S. Br. *J. Pharmacol.* **2003**, 139 (1), 28–34.
- (28) Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; De Cássia Gonçalves Alfenas, R.; De Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, *J. Rev. Nutr.* **2010**, 23 (4), 629–643.
- (29) Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. *Quim. Nova* **2006**, 29 (1), 113–123.
- (30) Habig, W. H.; PABST, M. J.; Jakoby, W. B. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249 (22), 7130–7140.
- (31) Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. D. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. D. S.; Kubota, L. T. *Quim. Nova* **2007**, 30 (5), 1323–1338.
- (32) Wang, D.; Pei, X. Y.; Zhao, W. L.; Zhao, X. F. *Cell Calcium* **2016**, 60 (1), 1–12.
- (33) Franco, R.; Sánchez-Oleab, R.; Reyes-Reyesc, E. M.; Panayiotidis, M. I. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2009**, 674 (1–2), 3–22.
- (34) Creasy, D. M. *Toxicol. Pathol.* **1997**, 25 (2), 119–131.
- (35) Creasy, D. M. *Toxicol. Pathol.* **2001**, 29 (1), 64–76.

- (36) Lanning, L. L.; Creasy, D. M.; Chapin, R. E.; Mann, P. C.; Barlow, N. J.; Regan, K. S.; Goodman, D. G. *Toxicol. Pathol.* **2002**, 30 (4), 507–520.
- (37) Rosiepen, G.; Chapin, R. E.; Weinbauer, G. F. *J. Androl.* **1995**, 16, 127–135.
- (38) Sung, W. K. *Jap. J. Vet. Res* **1976**, 24, 43–50.
- (39) Brilhante, O.; Okada, F. K.; Sasso-Cerri, E.; Stumpp, T.; Miraglia, S. M. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2012**, 10, 79.
- (40) Hess, R. A.; Linder, R.; Strader, L.; Perreault, S. *J. Androl.* **1988**, 9 (5), 327–342.
- (41) Gomes, M. L. M.; Monteiro, J. C.; Freitas, K. M.; Sbervelheri, M. M.; Dolder, H. *Biol. Res.* **2011**, 44 (3), 235–241.
- (42) Monteiro, J. C.; da Matta, S. L. P.; Predes, F. S.; de Paula, T. A. R. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2012**, 55 (1), 101–105.
- (43) Oshio, L. T.; Ribeiro, C.C.T.; Marques, R. M.; M.O., G.; Matta, S.L.P.; Reis, J.E.P.; Silveira e Sa, R.C.; Campos, L.V.; Peters, V. M. *J. Med. Plants Res.* **2015**, 9 (5), 122–131.
- (44) Melo, F. C. S. A.; Matta, S. L. P.; Paula, T. A. R.; Gomes, M. L. M.; Oliveira, L. *C. Biol. Res.* **2010**, 43 (4), 445–450.
- (45) Boockfor, F. R.; Barnes, M. A.; Dickey, J. F. *J. Anim. Sci.* **1983**, 56 (6), 1386–1392.
- (46) Hochereau-de-Reviers, M. T.; Land, R. B.; Perreau, C.; Thompson, R. *J. Reprod. fert* **1984**, 70, 157–163.
- (47) Kosco, M. S.; Loseth, K. J.; Crabo, B. G. *J. Reprod. Fertil.* **1989**, 87 (1), 1–11.
- (48) Jarrar, B. M. *Drug Metab. Lett.* **2011**, 5, 99–103.
- (49) Benetti, F.; Gomes-Filho, J. E.; Ferreira, L. L.; Ervolino, E.; Briso, A. L. F.; Sivieri-Araújo, G.; Dezan-Júnior, E.; Cintra, L. T. A. *Arch. Oral Biol.* **2017**, 81 (June 2016), 103–109.
- (50) Russell, L.; Ettlín, R.; Sinha Hikim, A.; Clegg, E. *In Histological and histopathological evaluation of the testis*; Russell, L., Ettlín, R., Sinha Hikim, A., Clegg, E., Eds.; Florida, **1990**; p 1–40a.
- (51) Karnovsky, M. J. *J. Cell Biol.* **1965**, 27 (15), 137.
- (52) Amann, R. *Fertil Steril* **1970**, 21, 662–672.
- (53) 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. *Vet. Res. Commun.* **2005**, No. 7, 629–643.
- (54) Dorst VJ, S. H. *Monotsh Ver Med* **1974**, No. 29, 650–652.

- (55) Amann, R. P.; Schanbacher, B. D. *J. Anim. Sci.* **1983**, No. 57, 380–403.
- (56) Amann, R.; Almquist, J. *Dairy Sci* **1962**, No. 45, 774–781.
- (57) Amann, R. P. *AmJ Anat.* **1961**, 110 (1), 49–67.
- (58) Roosen-Runge, E. C. *Anat. Rec.* **1955**, 123 (4), 385–398.
- (59) Russell, L.D.; Ettlin, R.A.; Sinha Hikim, A.P.; Clegg, E.D. In *Histological and histopathological evaluation of the testis*; Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., Eds.; Florida, **1990**; p 210–266b.
- (60) Boekelheide, K. In *Sertoli Cell Biology*; Skinner, M., Griswold, M., Eds.; San Diego, **2005**; pp 345–382.
- (61) Johnsen, S. G. *Hormones* **1970**, No. 1, 2–25.
- (62) Giri, B. R.; Roy, B. *Parasitol. Res.* **2016**, 2617–2624.
- (63) Bai Aswathanarayan, J.; Rai Vittal, R.; Muddegowda, U. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2017**, 0 (0), 1–8.
- (64) Tzeng, C. W.; Tzeng, W. S.; Lin, L. T.; Lee, C. W.; Yen, F. L.; Lin, C. C. *Phytomedicine* **2016**, 23 (5), 528–540.
- (65) Oberholzer, M.; Ostreicher, M.; Christen, H.; Brühlmann, M. *Histochem. Cell Biol.* **1996**, 105 (5), 333–355.
- (66) Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, M. D. *Nitric Oxide* **2002**, 6 (2), 178–185.
- (67) Oliveira, J.M.; Losano, N.F.; Condessa, S.S.; Freitas, R.M.P.; Cardoso, S.A.; Freitas, M.B.; Oliveira, L.L. *Ecotox and Environ Safe* **2018**, 148, 684–692
- (68) Siddiqui, I. A.; Raisuddin, S.; Shukla, Y. *Cancer Lett.* 2005, 227 (2), 125–132.
- (69) Aebi, H. *Methods Enzymol.* **1984**, 105 (1947), 121–126.
- (70) Wallin, B.; Rosengren, B.; Shertzer, H. G.; Camejo, G. *Anal. Biochem.* **1993**, pp 10–15.
- (71) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, L.; Rabdall, R. *J. Anal. Biochem.* **1951**, 193, 265–275.

## Figura

**Figura 1:** Cromatograma do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomeratopara*. Nodetalhe varredura do pico do composto majoritário.



## Tabelas

Tabela1: Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

Classes de compostos	EHRPG
Tanino	+
Flavonoides	+
Saponinas	+
Cumarinas	+
Antraquinonas	-
Triterpenos/esteroides	+
Alcaloides	+

**Tabela 2:** Frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, caracterizado de acordo com método da morfologia tubular.

	Controle	Citrato de Sildenafil	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE 200mg/kgD
<b>Estádio I</b>	7,80±1,72 <sup>a</sup>	6,20±2,59 <sup>a</sup>	2,50±0,50 <sup>b</sup>	4,80±0,45 <sup>a</sup>	6,30±1,46 <sup>a</sup>	10,70±4,76 <sup>a</sup>
<b>Estádio II</b>	11,20±3,77 <sup>a</sup>	12,40±1,67 <sup>a</sup>	9,00±2,55 <sup>a</sup>	10,80±2,59 <sup>a</sup>	13,00±3,74 <sup>a</sup>	16,00±8,75 <sup>a</sup>
<b>Estádio III</b>	14,20±2,11 <sup>a</sup>	11,20±3,27 <sup>a</sup>	18,40±3,21 <sup>a</sup>	18,40±4,04 <sup>a</sup>	16,10±4,95 <sup>a</sup>	9,80±4,40 <sup>a</sup>
<b>Estádio IV</b>	1,00±0,50 <sup>a</sup>	1,60±1,34 <sup>a</sup>	4,70±7,78 <sup>a</sup>	0,80±0,27 <sup>a</sup>	2,00±1,22 <sup>a</sup>	0,70±0,57 <sup>a</sup>
<b>Estádio V</b>	11,60±2,46 <sup>a</sup>	12,20±3,35 <sup>a</sup>	11,75±2,05 <sup>a</sup>	9,80±1,10 <sup>a</sup>	11,2±3,70 <sup>a</sup>	9,30±2,41 <sup>a</sup>
<b>Estádio VI</b>	21,80±5,74 <sup>a</sup>	22,60±4,04 <sup>a</sup>	30,84±8,95 <sup>a</sup>	24,80±7,54 <sup>a</sup>	25,00±10,63 <sup>a</sup>	27,20±13,10 <sup>a</sup>
<b>Estádio VII</b>	14,90±3,85 <sup>a</sup>	13,60±3,97 <sup>a</sup>	24,99±3,01 <sup>b</sup>	19,80±7,09 <sup>a</sup>	17,80±5,02 <sup>a</sup>	25,20±1,03 <sup>b</sup>
<b>Estádio VIII</b>	18,30±7,13 <sup>a</sup>	15,20±6,02 <sup>a</sup>	3,74±1,83 <sup>b</sup>	10,80±3,96 <sup>a</sup>	9,30±3,70 <sup>a</sup>	5,65±2,50 <sup>b</sup>

Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/Kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/Kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

**Tabela 3.** Parâmetros biométricos, corporal e testicular, de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE).

	Controle	Citrato de Sildenafil	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE 200mg/kg D
PC (g)	37,28±0,38 <sup>a</sup>	39,27±4,93 <sup>a</sup>	41,34±3,88 <sup>a</sup>	41,2±3,19 <sup>a</sup>	42,13±2,07 <sup>a</sup>	35,32±0,86 <sup>a</sup>
PT(g)	0,195±0,04 <sup>a</sup>	0,230±0,02 <sup>ab</sup>	0,239±0,02 <sup>ab</sup>	0,246±0,03 <sup>ab</sup>	0,257±0,04 <sup>b</sup>	0,264±0,01 <sup>b</sup>
PA (g)	0,024±0,01 <sup>a</sup>	0,030±0,05 <sup>a</sup>	0,026±0,05 <sup>a</sup>	0,028±0,08 <sup>a</sup>	0,032±0,03 <sup>a</sup>	0,031±0,06 <sup>a</sup>
PP (g)	0,171±0,04 <sup>a</sup>	0,200±0,02 <sup>a</sup>	0,213±0,02 <sup>a</sup>	0,218±0,06 <sup>a</sup>	0,225±0,04 <sup>a</sup>	0,233±0,02 <sup>b</sup>
IGS (%)	0,52±0,11 <sup>a</sup>	0,60±0,11 <sup>a</sup>	0,58±0,07 <sup>ab</sup>	0,60±0,06 <sup>ab</sup>	0,61±0,10 <sup>a</sup>	0,75±0,04 <sup>b</sup>
IPS (%)	0,46±0,12 <sup>a</sup>	0,52±0,11 <sup>a</sup>	0,52±0,06 <sup>a</sup>	0,53±0,06 <sup>a</sup>	0,54±0,10 <sup>a</sup>	0,66±0,05 <sup>b</sup>

PC – peso corporal; PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea; PP-Peso do parênquima; IGS – Índice gonadosomático; IPS – Índice parenquimossomático. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

**Tabela 4:** Densidade volumétrica (%), volume (mL) dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE)

	Controle	Citrato de Sildenafil	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE 200mg/kg D
<b>T (%)</b>	93,02±0,98 <sup>a</sup>	89,97±1,29 <sup>bc</sup>	89,07±1,30 <sup>d</sup>	89,34±1,03 <sup>cd</sup>	88,61±1,04 <sup>cd</sup>	91,34±0,64 <sup>ab</sup>
<b>E (%)</b>	71,80±3,67 <sup>a</sup>	67,55±2,08 <sup>b</sup>	65,98±0,78 <sup>b</sup>	66,99±0,84 <sup>b</sup>	65,21±1,79 <sup>b</sup>	67,43±1,25 <sup>b</sup>
<b>TP (%)</b>	8,04±1,39 <sup>a</sup>	8,52±1,38 <sup>a</sup>	8,45±0,53 <sup>a</sup>	9,09±1,26 <sup>a</sup>	9,98±0,28 <sup>a</sup>	9,42±1,13 <sup>a</sup>
<b>L (%)</b>	13,18±1,93 <sup>a</sup>	13,90±1,32 <sup>a</sup>	14,64±1,96 <sup>a</sup>	13,26±2,47 <sup>a</sup>	13,42±2,23 <sup>a</sup>	14,49±0,83 <sup>a</sup>
<b>VT (mL)</b>	0,079±0,019 <sup>a</sup>	0,090±0,012 <sup>a</sup>	0,094±0,006 <sup>a</sup>	0,098±0,022 <sup>a</sup>	0,099±0,018 <sup>a</sup>	0,106±0,009 <sup>b</sup>
<b>VE (mL)</b>	0,061±0,014 <sup>a</sup>	0,068±0,013 <sup>a</sup>	0,070±0,006 <sup>a</sup>	0,073±0,009 <sup>a</sup>	0,073±0,005 <sup>a</sup>	0,078±0,005 <sup>a</sup>
<b>VTP (mL)</b>	0,007±0,002 <sup>a</sup>	0,008±0,001 <sup>ab</sup>	0,009±0,0007 <sup>ab</sup>	0,010±0,0008 <sup>ab</sup>	0,011±0,0012 <sup>b</sup>	0,011±0,0012 <sup>b</sup>
<b>VL (mL)</b>	0,011±0,004 <sup>a</sup>	0,014±0,002 <sup>a</sup>	0,015±0,001 <sup>a</sup>	0,015±0,004 <sup>a</sup>	0,015±0,0033 <sup>a</sup>	0,017±0,0014 <sup>a</sup>
<b>ITS (%)</b>	0,43±0,11 <sup>a</sup>	0,47±0,11 <sup>a</sup>	0,46±0,05 <sup>a</sup>	0,48±0,05 <sup>a</sup>	0,48±0,09 <sup>a</sup>	0,61±0,04 <sup>b</sup>
<b>IES (%)</b>	0,33±0,08 <sup>a</sup>	0,35±0,08 <sup>a</sup>	0,34±0,05 <sup>a</sup>	0,35±0,04 <sup>a</sup>	0,35±0,06 <sup>a</sup>	0,44±0,03 <sup>b</sup>

T – percentual de Túbulo seminífero; E - percentual de epitélio seminífero; TP – Percentual de Túnica Própria; L-Percentual de Lúmen; VT – Volume de túbulo seminífero; VE – Volume de Epitélio; VTP – Volume de Túnica Própria; VL – Volume de Lúmen; ITS – Índice Tubulossomático; IES – Índice Epiteliossomático. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

**Tabela 5:** Estereologia de túbulo seminífero de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE)

	Controle	Citrato de Sildenafil	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE 200mg/kg D
<b>DT (µm)</b>	192,85±6,24 <sup>a</sup>	189,13±9,71 <sup>a</sup>	195,27±8,63 <sup>a</sup>	186,96±6,23 <sup>a</sup>	190,28±4,63 <sup>a</sup>	210,10±8,11 <sup>b</sup>
<b>AE(µm)</b>	75,52±2,73 <sup>a</sup>	72,27±2,16 <sup>ab</sup>	64,02±7,97 <sup>c</sup>	69,84±3,75 <sup>ac</sup>	72,16±2,55 <sup>ab</sup>	67,39±3,04 <sup>bc</sup>
<b>DL(µm)</b>	41,81 7,35 <sup>a</sup>	44,59 6,0 <sup>a</sup>	67,22 17,98 <sup>b</sup>	47,28 9,90 <sup>a</sup>	45,97 7,94 <sup>a</sup>	75,32 10,30 <sup>b</sup>
<b>CTS/t (m)</b>	5,40±1,16 <sup>a</sup>	6,52±0,86 <sup>a</sup>	6,39±0,91 <sup>a</sup>	7,12±0,61 <sup>a</sup>	7,15±1,57 <sup>a</sup>	6,22±0,87 <sup>a</sup>
<b>CTS/gT (m/g)</b>	27,78±1,98 <sup>a</sup>	28,27±2,33 <sup>a</sup>	26,66±2,29 <sup>ab</sup>	29,17±2,64 <sup>a</sup>	27,60±1,72 <sup>ab</sup>	23,52±2,14 <sup>b</sup>
<b>Área do túbulo (µm<sup>2</sup>x10<sup>4</sup>)</b>	29221,0 ±18883,04 <sup>a</sup>	281396±2877,69 <sup>a</sup>	29978±2614,54 <sup>a</sup>	27463±1823,83 <sup>a</sup>	28436±1382,99 <sup>a</sup>	34693±2709,52 <sup>b</sup>
<b>Área do lume (µm<sup>2</sup>x10<sup>4</sup>)</b>	117,33±6,2 <sup>a</sup>	116,86±7,77 <sup>a</sup>	131,24±11,63 <sup>b</sup>	117,12±7,3 <sup>a</sup>	118,13±5,98 <sup>a</sup>	142,71±8,76 <sup>b</sup>
<b>Área do epitélio (µm<sup>2</sup>x10<sup>4</sup>)</b>	29103,0±1877,39 <sup>a</sup>	28022,0±2869,96 <sup>a</sup>	29847±2626,19 <sup>a</sup>	27346,0±1817,51 <sup>a</sup>	28318,0±1377,53 <sup>a</sup>	34550,0±2701,36 <sup>b</sup>
<b>RTE ‘</b>	1,31±0,05 <sup>a</sup>	1,31±0,03 <sup>a</sup>	1,55±0,24 <sup>b</sup>	1,34±0,08 <sup>a</sup>	1,32±0,06 <sup>a</sup>	1,56±0,09 <sup>b</sup>

DT – Diâmetro de túbulo; AE- altura do Epitélio; DL- Diâmetro de Lume; CTS/t- Comprimento total de túbulo seminífero; CTS/g- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo e RET – Relação túbulo/Epitélio. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

**Tabela 6:** Número corrigido de células no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, índices espermáticos, número de células de Sertoli e produção espermática diária de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE)

	Controle	Citrato de Sildenafil	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE 200mg/kg D
<b>SGA</b>	0,70±0,17 <sup>a</sup>	0,65±0,11 <sup>a</sup>	0,72±0,03 <sup>a</sup>	0,66±0,11 <sup>a</sup>	0,70±0,15 <sup>a</sup>	0,78±0,16 <sup>a</sup>
<b>PL/L</b>	24,89±1,52 <sup>a</sup>	21,80±0,54 <sup>a</sup>	23,78±2,80 <sup>a</sup>	21,16±1,69 <sup>a</sup>	23,69±2,19 <sup>a</sup>	20,79±1,66 <sup>a</sup>
<b>PAQ</b>	24,65±1,64 <sup>a</sup>	23,03±1,08 <sup>a</sup>	21,81±1,37 <sup>a</sup>	21,55±1,58 <sup>a</sup>	23,47±1,49 <sup>a</sup>	22,63±0,96 <sup>a</sup>
<b>EAR</b>	57,99±4,04 <sup>a</sup>	62,53±5,10 <sup>a</sup>	61,40±5,75 <sup>a</sup>	60,52±2,27 <sup>a</sup>	59,78±5,57 <sup>a</sup>	62,11±2,84 <sup>a</sup>
<b>SER</b>	6,49±0,5 <sup>a</sup>	5,98±0,3 <sup>a</sup>	5,29±0,3 <sup>b</sup>	5,43±0,7 <sup>b</sup>	5,67±0,9 <sup>a</sup>	5,52±0,1 <sup>b</sup>
<b>IMI</b>	36,69±9,50 <sup>a</sup>	35,02±6,41 <sup>a</sup>	32,93±4,08 <sup>a</sup>	32,78±4,71 <sup>a</sup>	35,79±13,53 <sup>a</sup>	27,53±6,50 <sup>b</sup>
<b>IME</b>	2,35±0,07 <sup>a</sup>	2,71±0,15 <sup>b</sup>	2,82±0,09 <sup>b</sup>	2,82±0,23 <sup>b</sup>	2,55±0,34 <sup>ab</sup>	2,75±0,14 <sup>b</sup>
<b>ICS</b>	8,98±0,42 <sup>a</sup>	10,49±1,41 <sup>a</sup>	11,62±0,99 <sup>a</sup>	11,34±1,95 <sup>a</sup>	10,78±2,44 <sup>a</sup>	11,26±0,71 <sup>a</sup>
<b>SER/t</b>	11,57±1,94 <sup>a</sup>	12,46±1,26 <sup>a</sup>	10,81±1,51 <sup>a</sup>	12,78±2,88 <sup>a</sup>	11,80±0,99 <sup>a</sup>	10,79±1,52 <sup>a</sup>
<b>SER/gt</b>	60,18±8,54 <sup>a</sup>	54,23±4,85 <sup>ab</sup>	45,19±4,30 <sup>bc</sup>	52,22±11,00 <sup>bc</sup>	46,34±5,31 <sup>bc</sup>	40,81±3,52 <sup>c</sup>
<b>CSS</b>	16,76±0,75 <sup>a</sup>	18,11±2,01 <sup>a</sup>	20,41±1,30 <sup>a</sup>	19,51±3,67 <sup>a</sup>	19,33±3,66 <sup>a</sup>	19,26±0,97 <sup>a</sup>
<b>RGE</b>	85,12±20,5 <sup>a</sup>	101,63±25,67 <sup>a</sup>	85,11±10,97 <sup>a</sup>	94,90±21,61 <sup>a</sup>	90,87±35,59 <sup>a</sup>	81,86±14,43 <sup>a</sup>
<b>PDE/t</b>	4,61±0,6 <sup>a</sup>	4,93±1,25 <sup>a</sup>	4,57±0,6 <sup>a</sup>	4,55±0,7 <sup>a</sup>	4,85±0,9 <sup>a</sup>	6,05±0,4 <sup>a</sup>
<b>PDE/gt</b>	47,76±29,92 <sup>a</sup>	42,54±6,61 <sup>a</sup>	35,66±7,96 <sup>a</sup>	34,99±5,63 <sup>a</sup>	37,28±11,04 <sup>a</sup>	45,45±2,77 <sup>a</sup>

SGA – Espermatogônia A; PL/L-Preleptóteno/ Leptóteno; PAQ – Paquíteno; EAR – Espermátide arredondada; SER – Célula de Sertoli; IMI – Índice Mitótico; IME – Índice meiótico; ICS – Índice de célula de Sertoli; SER/t – Número de célula de Sertoli por testículo; SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama e testículo; CSS – Capacidade de suporte de Sertoli; RGE – Rendimento geral da espermatogênese; PDE/t – Produção espermática diária por testículo; PDE/gt – Produção espermática diária por grama de testículo. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

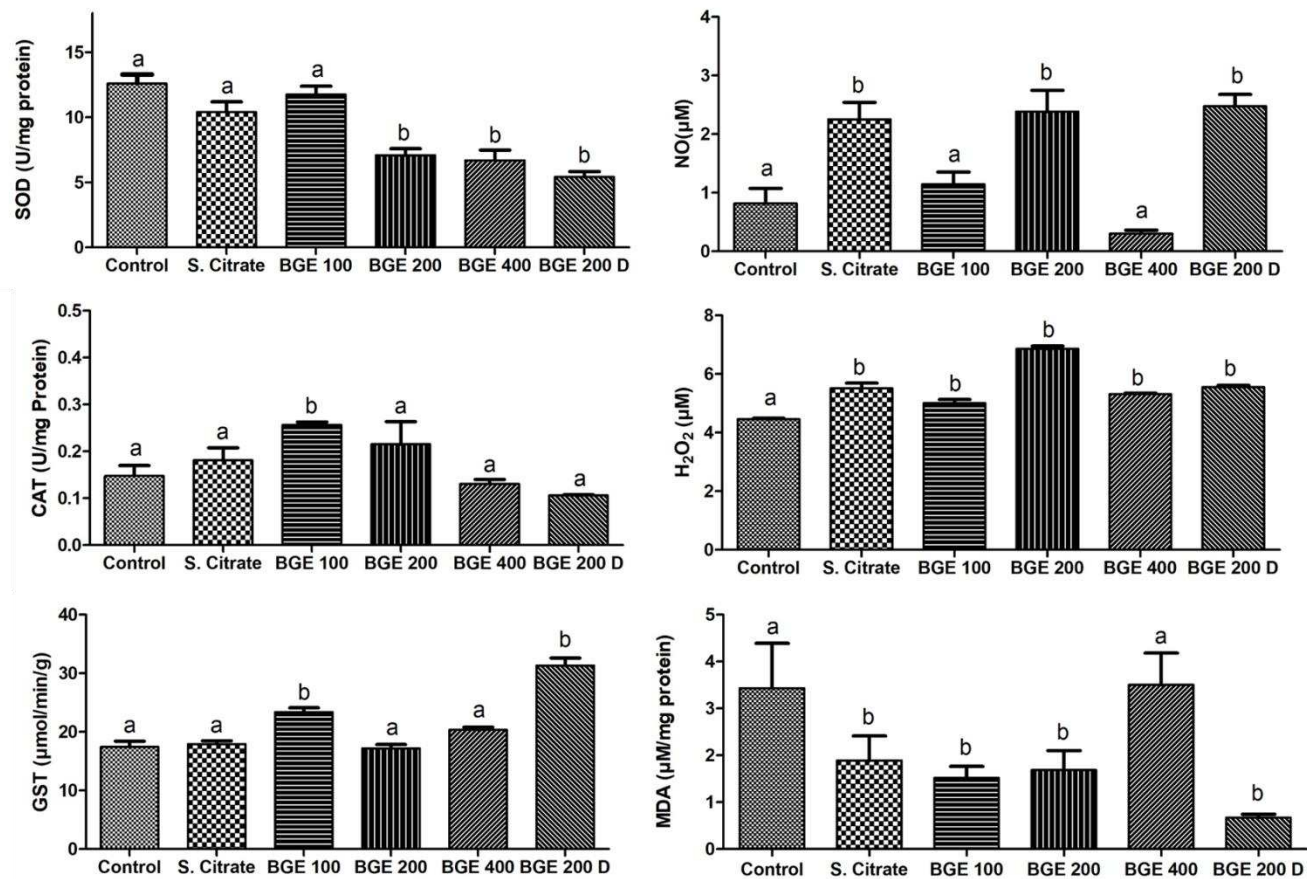
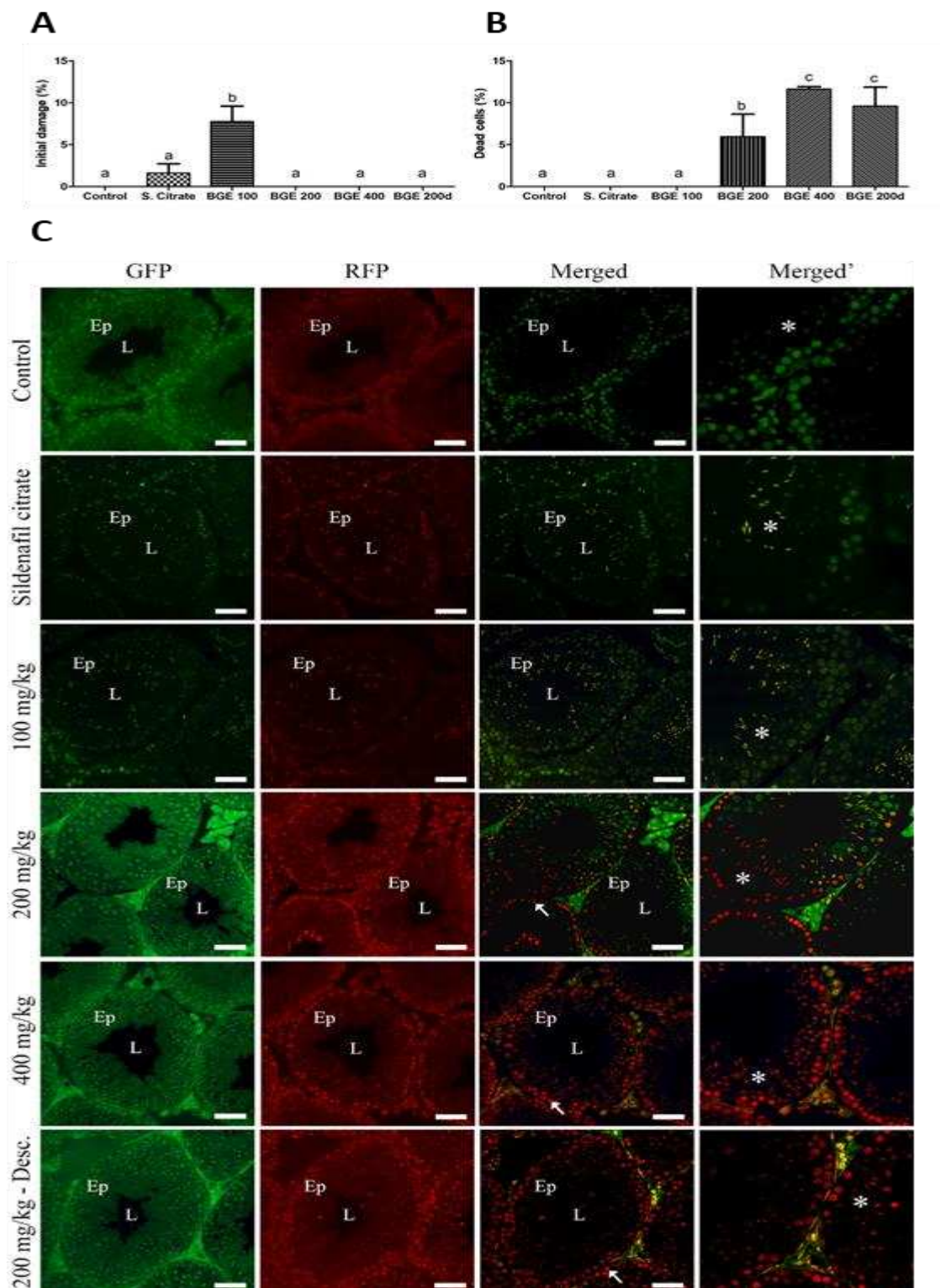
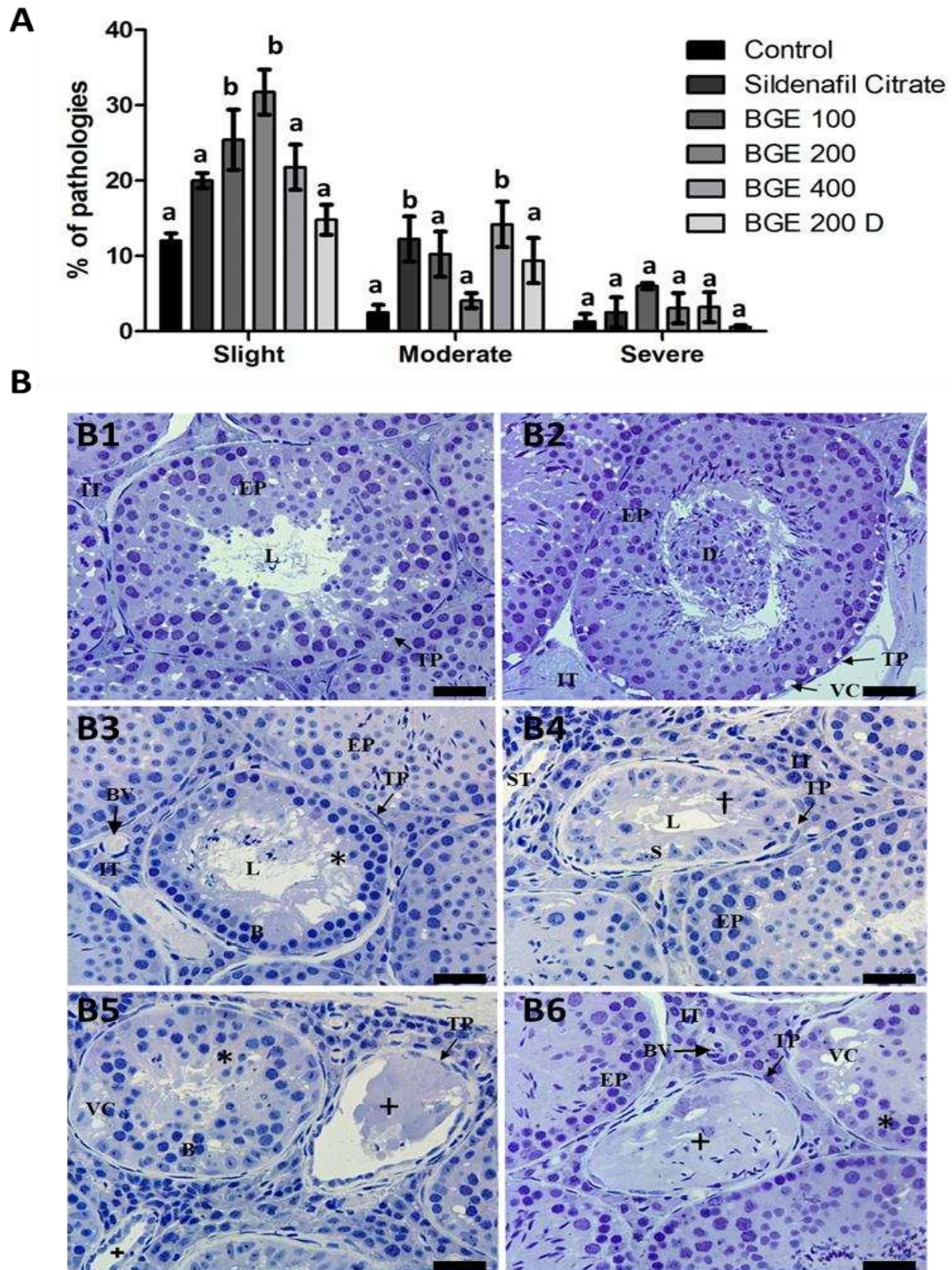


Figura 2: Atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GST), óxido nítrico, malondialdeído, e proteína total em testículo de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (BGE). G1- Controle negativo (água); G2- Controle positivo (Citrate de Sildenafil); G3- BGE 100mg/kg; G4- BGE 200mg/kg; G5- BGE 400mg/kg; G6- BGE 200mg/kg descontinuo. SOD – Superóxido dismutase, CAT – Catalase, NO – Óxido nítrico, GST – Glutaciona, MDA- Malondialdeído, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de hidrogênio.



**Figura 3:** A – Percentual inicial de dano; B- Percentual de células mortas; C- Secção histológica de testículo de animais tratados com extrato hidroalcolico de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE). Laranja de acridina e Iodeto de propídio, dupla marcação para detecção de morte celular. Filtro GFP (50 nm); Filtro RFP (580nm); Merged (Sobreposição das imagens); Merged' - ampliação do Merged. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d). Ep – epitélio; L- Lume; núcleos verdes - Células viáveis; Núcleos amarelos - células com processo inicial de morte; Núcleos vermelhos- Células mortas. \* evidenciando células germinativas. Barra=50µm.



**Figura 4:**A – proporção de túbulos seminíferos patológicos; B- Secção histológica de testículo de animais tratados com extrato hidroalcolico de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE) evidenciando as patologias encontradas. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d). ST – Túbulo seminífero; EP – Epitélio seminífero; TP-Túnica Própria; L - Lúmen; D- Descamação; IT – Intertúbulo; B – Células basais; S – Sertoli; BV- Vaso sanguíneo; VC – vacúolo; \* - Túbulo seminífero apenas com células basais; + - Túbulo seminífero desprovido de células germinativas; † - Túbulo seminífero apenas com células de Sertoli (Sertoli only tubules). Corte de 2 µm corados com HE/Azul de toluidina. Barra = 20 µm.



**CAPITULO 3:**

**Ação estimulante do Ginseng brasileiro nos corpos cavernosos e tecido intertubular testicular e efeitos colaterais nas células de Leydig, e na concentração de testosterona sérica de camundongos adultos**

À ser Submetido na Revista Fertility and Sterility (ISSN – 0051-0282)

**Fertility  
and Sterility.**

# **Ação estimulante do Ginseng brasileiro nos corpos cavernosos e tecido intertubular testicular e efeitos colaterais nas células de Leydig, e na concentração de testosterona sérica de camundongos adultos**

F.C.R. Dias; S.L.P. Matta e colaboradores

## **ABSTRACT**

The use of plants with aphrodisiac action in folk medicine is an ancient practice that deserves to be investigated scientifically, in order to evaluate the risks and benefits of its use, demystifying or validating its application. The objective of this study was to evaluate the action of the hydroalcoholic extract of the root of *Pfaffia glomerata* on the morphometry and stereology of Leydig cells and other components of the intertubular compartment, cavernous bodies and penile constituents and on the serum testosterone concentration and  $17\beta$ -estradiol of mice adults. Adult mice were randomly divided into 6 groups: positive control (sildenafil citrate), negative control (water), 3 groups receiving daily doses (100, 200 and 400 BGE mg / kg) and an intermittent dose (200 BGE mg / kg a every three days). There was an increase in the percentage and volume of blood vessels and lymphatic space, reduction of testosterone, increase of estradiol and death of Leydig cells. As for penile parameters, there was an increase of cavernous bodies, increase of collagen, reduction of smooth muscle and increase of nitric oxide. We conclude that the treatment with the extract of Brazilian ginseng is related to the increase of the NO, acting on the blood vessels, increasing the cavernous bodies, causing a reduction of the smooth muscle of the penis. In addition, it causes damage to Leydig cells that are impaired in the synthesis of androgen accumulating lipid droplets in its cytoplasm leading, even, to the death of the cell. It is understood that the increase in estradiol and penile collagen has been an attempt to reverse the effects of BGE. Thus, Brazilian ginseng has an aphrodisiac action, but with side effects on testosterone production and Leydig cell viability.

**Palavra-chave:** Estradiol, Colágeno,

## INTRODUÇÃO

Em várias partes do mundo há uma multiplicidade de terapias baseadas em plantas com finalidade de restaurar a ereção (1) e manter a saúde sexual em geral (2–4). Essas terapias são muito atraentes por serem baratas e pelos consumidores acreditarem que elas não possuem efeitos colaterais, já que é algo natural (5). Dentre as plantas utilizadas está a *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, popularmente conhecida como fáfia ou ginseng brasileiro(6).

A *Pfaffia glomerata* pertence à família Amaranthaceae e encontra-se distribuída em toda América do Sul, desde as Guianas até Bolívia e Argentina. No Brasil ocorre principalmente nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul (7) ao longo de formações florestais e campestres. O interesse comercial por essa planta está associado principalmente às suas raízes tuberosas, que são bastante utilizadas na medicina popular (8) como estimulante geral (7) e afrodisíaco, definido como qualquer alimento ou droga que desperte o instinto sexual, induza o desejo e aumente o prazer ou o desempenho sexual (9).

Os afrodisíacos podem atuar alterando o nível hormonal através de estímulos nas células produtoras de testosterona, as células de Leydig, alterando a fisiologia peniana, ou agindo no relaxamento do músculo liso, aumentando o fluxo sanguíneo e permitindo a vasodilatação dos corpos cavernosos, facilitando assim a ereção peniana (9–13). No entanto, a maioria dos agentes afrodisíacos agem alterando os níveis de testosterona (9,14), que é requerida em altas concentrações nos testículos a fim de manter a espermatogênese, promover a diferenciação do trato genital masculino, além de promover e manter os caracteres sexuais secundários (15,16).

O ginseng brasileiro está incluído entre esses afrodisíacos possivelmente por aumentar os níveis de testosterona (1) e de óxido nítrico sistêmico (17,18). O óxido nítrico por sua vez ativa a guanilato ciclase, aumentando o nível de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), produzindo relaxamento muscular, vasodilatação peniana (19) causando no pênis ereção.

Sabe-se também que o composto majoritário da *Pfaffia glomerata*, a  $\beta$ -ecdisona, apresenta atividade estrogênica em fêmeas (20) e que, em machos, o estrógeno tem função erétil e libidinosa (21), dando assim à planta, propriedades afrodisíacas.

Dessa forma, a *Pfaffia glomerata* é considerada como altamente promissora, mas pouco conhecida sob qualquer ponto de vista. Essa planta possui ampla utilização medicinal, com comercialização de produtos contendo seus compostos, porém são raros

os estudos científicos que testaram a eficácia e os riscos da sua utilização, principalmente sobre a sexualidade masculina. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* sobre a morfometria e estereologia das células de Leydig e demais componentes do compartimento intertubular, dos corpos cavernosos, componentes penianos e sobre a concentração de testosterona sérica e 17  $\beta$ -estradiol de camundongos adultos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

A matriz de *P. glomerata* (AC22) 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, Brasil, e cultivada em estufas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. As plantas usadas neste experimento foram provenientes do banco de germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFV (LCT – Bioagro – UFV), sendo cultivadas no Sítio Bela Vista, Vila Valério, Espírito Santo, Brasil (18°58'55.5"S 40°15'17.8"W) e coletadas em novembro de 2015. As raízes foram coletadas após 1 ano de plantio, secas em estufa a 55°C e trituradas em moinho de facas (SL32, Solab). Um espécime testemunho foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger - CESJ-UFJF, Minas Gerais, Brasil (CES 63317).

### **Animais experimentais**

Todos os procedimentos experimentais seguiram os padrões determinados pelo CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, sendo aprovado pela CEUA – UFV (Comissão de Ética em Uso de Animais) da Universidade Federal de Viçosa sob o protocolo N°44/2015. Foram utilizados 36 camundongos Swiss machos em idade reprodutiva (55 dias), divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=6) e colocados em gaiolas coletivas. Os grupos foram definidos como: G1- água; G2- Citrato de sildenafil; G3- 100 mg/kg de extrato do Ginseng Brasileiro (BGE); G4- 200 mg/kg de BGE; G5- 400 mg/kg de BGE e G6- 200 mg/kg de BGE de modo descontínuo (3-3 dias). O extrato foi ressuspendido em água. Uma vez que a planta é utilizada com o intuito de aumentar a libido e conseqüentemente atividade sexual, utilizou-se o Citrato de Sildenafil como controle positivo por ele ser um inibidor potente e seletivo da Fosfodiesterase 5 (PDE5). Esse fármaco estimula o

aumento da produção de óxido nítrico (22,23) e assim tem efeito na ereção, sendo largamente utilizado e com eficácia comprovada. Os animais dos grupos 1 a 5 receberam tratamento diário por 42 dias, enquanto os animais do grupo 6 receberam o extrato administrado descontinuamente a cada 3 dias pelo mesmo período, considerando que o tratamento contínuo pode ter efeito adaptativo nos animais. Todos os tratamentos foram administrados por gavagem e cada animal recebeu 0,5mL de solução/água.

Os animais foram divididos nos respectivos grupos (peso médio 40g) iniciando-se o período experimental. Todos os grupos foram mantidos em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade (60-70%) e luz controladas (ciclo claro-escuro 12/12 h), tendo acesso a alimento e água ad libitum. O tratamento teve duração de 42 dias consecutivos, considerando-se a duração do ciclo do epitélio seminífero no camundongo (24).

### **Coleta de materiais e microscopia de luz**

Após 24h do término do período experimental, os animais foram anestesiados com tiopental intraperitoneal (30mg/kg) e o sangue foi retirado por punção cardíaca. Os testículos e pênis foram removidos, dissecados e pesados, sendo o testículo esquerdo fixado em Karnovsky (25) e destinado para avaliação histomorfométrica. O pênis foi dividido entre corpo e base, sendo o corpo destinado a histologia e a base congelada -  $80^\circ\text{C}$  para análise de óxido nítrico.

O testículo e pênis destinados à análise histológica foram desidratados em série crescente de etanol e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 3  $\mu\text{m}$  foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de no mínimo 40  $\mu\text{m}$  entre os cortes para testículo e 15  $\mu\text{m}$  para o pênis. As preparações histológicas foram coradas com azul de toluidina + borato de sódio (1%). Para as análises morfométricas foram utilizadas imagens digitais obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). Todas as imagens foram analisadas utilizando o software Image J® (National Institute of Health, USA).

### **Biometria corporal e testicular**

Os testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal foram pesados em balança de precisão (BEL Mark 160/0.0001g). Para determinar o peso do parênquima testicular

a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular foi calculado o índice gonadossomático (IGS- %) e o peso relativo dos órgãos a partir da divisão do peso pelo peso corporal e multiplicado por 100 (26).

## **Morfometria**

### *Proporção volumétrica e volume do intertúbulo e seus elementos*

A proporção volumétrica de intertúbulos foi estimada a partir da contagem de 266 pontos em 10 campos aleatórios, totalizando 2.660 pontos para cada animal. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado multiplicado pelo volume do parênquima testicular.

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 (núcleo e citoplasma). O volume (ml) dos elementos intertubulares foi calculado a partir da porcentagem do elemento no testículo/100, multiplicada pelo peso do parênquima de 2 testículos. Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (27,28), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

### *Diâmetro nuclear, 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 ( $\mu\text{m}^3$ ) 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;  $VC = \% \text{ de citoplasma} \times VN / \% \text{ de núcleo}$ ;  $VL = VN + VC$ . Os números de células de Leydig por testículo (NLT) e por grama de testículo (NLGT) foram calculados de acordo com as fórmulas:  $NLT = \text{volume que as células de Leydig ocupam por testículo} (\mu\text{m}^3) / \text{volume de uma célula de Leydig} (\mu\text{m}^3)$   $NLGT = \text{volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo} (\mu\text{m}^3) / \text{volume de uma célula de Leydig} (\mu\text{m}^3)$  Onde:  $\text{Volume que a células de Leydig ocupa por testículo} = \text{proporção da célula de Leydig no testículo} \times \text{peso do parênquima de um testículo} / 100$   $\text{Volume}$

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.

### **Viabilidade de célula no intertubulo**

Secções histológicas testiculares de 1µm foram coradas com corante duplo, laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), para avaliação das alterações morfológicas da apoptose celular e porcentagem de células mortas por apoptose (29). As imagens digitais foram capturadas por fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá). Laranja de acridina marca as células danificadas e vivas, enquanto o IP marca apenas as células que perderam a integridade da membrana, pois este não pode atravessar a membrana plasmática intacta. Os critérios morfológicos utilizados para a classificação de células saudáveis e mortas foram os seguintes: células viáveis mostram um núcleo verde e as células mortas exibem um núcleo vermelho denso (29,30). As imagens digitalizadas foram avaliadas utilizando-se o programa Image J® e as áreas reveladas com dupla marcação, laranja de acridina/iodeto de propídio, foram selecionadas por meio da distribuição de cor como parâmetro discriminante. Após a definição do intervalo de cor por meio de tentativa e erro foi selecionada a área que representava a quantidade de células em processo inicial de dano (amarelo/ alaranjado) ou células mortas (vermelho) em cada campo. Foi usada a técnica da Histofotometria Computadorizada. Foi quantificada uma área total de  $30 \times 104 \mu\text{m}^2$  para cada grupo.

### **Testosterona sérica e 17β-estradiol**

As concentrações plasmáticas de testosterona e 17β-estradiol foram obtidas pelo método de quimiluminescência. Para testosterona utilizou-se o kit Access® Testosterone (Beckman, USA), as leituras foram realizadas em aparelho Access II (Beckman, USA) e os resultados foram expressos em ng/dL. Para estradiol utilizou-se o

kit Access® Estradiol (Beckman, USA), as leituras foram realizadas em aparelho Access II (Beckman, USA) e os resultados foram expressos em pg/dL.

### **Morfometria dos corpos cavernosos**

As proporções volumétricas de corpos cavernosos e de tecido conjuntivo 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 transversais do pênis de cada animal. Para análise foram avaliados o corpo e a glândula do pênis, sendo os valores apresentados a média destes dados (31-33).

### **Quantificação de colágeno e músculo liso**

Para quantificação de colágeno os cortes de corpo e glândula do pênis foram corados com Picosirius. As preparações foram analisadas em microscópio de luz com um filtro polarizador acoplado a um analisador de imagem. Foram selecionados 10 campos de corpo e 10 de glândula do pênis, paracada grupo experimental, para a quantificação de músculo liso. Foi feita coloração com Tricrômico de Gomori, analisado em microscópio de luz e visualizados no aumento de 400X. Os colágenos (I e III) e o músculo liso foram quantificados com o auxílio do programa Image J® e as cores que identificam cada uma das estruturas foram selecionadas como parâmetro discriminante. Após a definição do intervalo de cor por meio de tentativa e erro foi selecionada a área que representava cada uma das estruturas. Foi usada a técnica da Histofotometria Computadorizada. Foi quantificada uma área total de  $30 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  foi analisada para cada grupo.

### **Óxido nítrico**

Os fragmentos de pênis foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) 0,2M combinado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1M e a suspensão foi centrifugada a 13,8 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi utilizado para a análise da concentração de óxido nítrico (NO) sendo as análises realizadas em duplicata. A produção de NO foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess padrão (34).

## **Análises Estatísticas**

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de  $p \leq 0,05$ . Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Com o objetivo de avaliar a diversidade entre os tratamentos existentes foi utilizada a análise dos componentes principais (ACP). Além disso, foi calculada a importância relativa das características avaliadas (35). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional Genes (36).

## **RESULTADOS**

### **Dados Biométricos**

Os parâmetros biométricos e testiculares encontram-se na tabela 1. O peso corporal (PC) não foi alterado entre os grupos experimentais, estando o peso testicular (PT) aumentado nos grupos 400mg/kg e 200mg/kgD em relação ao controle negativo. O índice gonadossomático (IGS) aumentou no grupo 200mg/kgD em relação ao controle. O peso do epidídimo reduziu nos grupos 100mg/kg e 200mg/kgD, o peso da próstata reduziu no grupo 200mg/kgD e o peso da vesícula seminal reduziu nos grupos 200mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kgD. Houve redução dos pesos relativos do epidídimo nos grupos Citrato de Sildenafil, 100mg/kg e 200mg/kgD, da vesícula seminal no grupo 200 mg/kg, mas não houve alteração na próstata. Embora nem todos os grupos tenham apresentado redução significativa, todos os grupos tenderam a apresentar pesos menores que o controle.

### **Morfometria**

O percentual de intertúbulo aumentou nos grupos tratados com citrato de sildenafil, 100, 200 e 400mg/kg em relação ao controle. O percentual de núcleo de Leydig aumentou nos grupos citrato de sildenafil, 200 e 400 mg/kg, e o percentual de citoplasma aumentou em todos os grupos experimentais em relação ao controle. O percentual de célula de Leydig aumentou os grupos citrato de sildenafil, 100, 200 e 400mg/kg em relação ao controle. O percentual de vaso sanguíneo aumentou nos grupos 100mg/kg e 200mg/kgD em relação ao controle, o espaço linfático aumentou nos grupos

100mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kgD em relação ao controle, o tecido conjuntivo aumentou nos grupos 200mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kg descontínuo enquanto os macrófagos não alteraram entre os grupos experimentais (Tabela 2).

O volume do intertúbulo aumentou em todos os grupos experimentais. O volume de núcleo de Leydig aumentou em todos os grupos experimentais em relação ao controle, mas o volume de citoplasma aumentou nos grupos 100, 200 e 400mg/kg. O volume de célula de Leydig aumentou nos grupos citrato de sildenafil, 100, 200 e 400mg/kg. O volume de vaso sanguíneo aumentou nos grupos 100mg/kg e 200mg/kgD em relação ao controle, o espaço linfático aumentou nos grupos 100mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kgD em relação ao controle e o tecido conjuntivo aumentou nos grupos 200mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kgD. O volume de macrófagos não alterou entre os grupos experimentais (Tabela 2). O aumento do volume citoplasmático das células de Leydig foi reflexo do aumento de gotículas de colesterol no citoplasma destas células (Figura 1).

O diâmetro nuclear e os volumes nuclear, citoplasmático e de Leydig( $\mu\text{m}^3$ ) reduziram no grupo tratado com 400mg/kg. O volume de Leydig por testículo e por grama de testículo aumentou nos grupos citrato de sildenafil, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400mg/kg e o número de Leydig por testículo e por grama de testículo, bem como o índice Leydigossomático, aumentaram no grupo 400mg/kg (Tabela 3).

### **Histopatologia**

O citoplasma das células de Leydig encontravam-se com gotículas de gordura (esteatose microvesicular), bem delineadas e opticamente vazias, que coalescem e produzem vesículas maiores (esteatose macrovesicular), caracterizando um degeneração. Todos estes parâmetros foram identificados nos grupos experimentais.

Degeneração micro – macro...

### **Avaliação de viabilidade celular**

Os animais do grupo controle, citrato de Sildenafil e 100mg/kg apresentaram somente células de Leydig viáveis. Porém, na dose de 200mg/kg as células estavam marcadas em amarelo mostrando dano inicial ao DNA e nas doses de 400mg/kg e 200mg/kgD, foram observadas células mortas, marcadas em vermelho, indicando dano celular (Figura 2).

### **Testosterona e 17 $\beta$ -Estradiol**

A testosterona plasmática aumentou no grupo citrato de Sildenafil e diminuiu nos grupos 200 mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kgD (Figura 3A). O 17 $\beta$ -estradiol aumentou nos grupos Citrato de sildenafil, 200 mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kgD (Figura 3B).

### **Morfometria do pênis**

O tecido conjuntivo foi reduzido nos grupos 200mg/kg contínuo e descontínuo e o corpo cavernoso aumentou nos grupos 200 e 400mg/kg e no 200mg/kgD (Figura 4).

### **Quantificação de colágeno e músculo liso**

O percentual de colágeno I aumentou no grupo 400mg/kg e 200mg/kgD, o colágeno III reduziu nos grupos tratados com BGE 100, 200, 400 e 200mg/kgD porém aumentou no grupo tratado com Citrato de Sildenafil (Figura 5). O percentual de músculo liso reduziu em todos os grupos experimentais (Figura 6)

### **Óxido Nítrico**

O óxido nítrico peniano aumentou nos grupos citrato de Sildenafil, 100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg, exceto no grupo descontínuo (Figura 7).

### **Agrupamento**

A separação dos grupos pelo método de Toucher ficou evidente como mostrado na Figura 8, já a importância relativa das variáveis (Figura 9) mostrou que todas as variáveis apresentadas são igualmente importantes para a separação dos grupos experimentais. A retirada de uma das variáveis mudaria a distribuição dos grupos.

## **DISCUSSÃO**

Em conjunto, nossos achados indicam que a *Pfaffia glomerata* causou alterações morfológicas, hormonais e moleculares nas células de Leydig e corpos cavernosos penianos de camundongos adultos. Em consonância com um modelo contínuo e prolongado de exposição a uma planta, com propriedades estimulantes sexuais, ocorreu aumento dos volumes de intertúbulo e de volume e número de células de Leydig nos testículos e também aumento dos corpos cavernosos e da concentração de óxido nítrico no pênis, além do aumento do estradiol plasmático. Porém, houve marcante redução dos

níveis séricos de testosterona, o que foi associado ao aumento do número de células de Leydig em processo de morte celular e a redução do pesos dos órgãos testosterona dependente. Como um modelo típico de ação fitoterápica, as alterações ocorreram de forma dependente da dose da planta.

O peso dos órgãos testosterona dependentes reduziu, sugerindo diminuição na testosterona, mas o peso testicular aumentou nos grupos tratados, o que pode indicar aumento do percentual ou volume de algum elemento testicular. Camundongos Balb C tratados com o ginseng brasileiro não apresentaram alteração nos parâmetros biométricos a não ser aumento do peso corporal (1). Isso mostra que as linhagens respondem de forma diferente a tratamentos semelhantes.

Houve aumento de percentual e volume de intertúbulo, devido ao aumento de percentual e volumetria verificados no citoplasma das células de Leydig, em todos os grupos experimentais e assim do volume destas células por testículo. Os percentuais e volumes dos vasos sanguíneos e espaço linfáticos aumentaram nos grupos experimentais. O espaço linfático tem papel fundamental na recirculação de fluidos, que banham os tecidos, trazidos pelos capilares sanguíneos ou produzidos por células, mantendo assim a homeostase normal (37–39). Segundo Fawcett (40), 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 aumento de núcleo e citoplasma de Leydig refletiu no aumento percentual desta célula e, conseqüentemente, no aumento do ILS. Estas variações não foram detectadas em camundongos BalbC tratados com ginseng brasileiro, apesar do ILS ter sido menor (1). Desde que o valor estimado de ILS para camundongos é de 0,03% (41), entende-se que os valores para ILS neste trabalho (0,036) estão dentro do normal.

O aumento da população de células de Leydig no BGE 400mg/kg está possivelmente associado a uma compensação do organismo diante de um número alto de células em processo de morte. Estas mortes foram confirmadas pela dupla marcação com laranja de acridina/iodeto de propídio, mostrando que as células de Leydig sofreram influência do tratamento e estavam em processo inicial de morte ou mesmo mortas, o que pode levar à redução na síntese e liberação de testosterona. Desse modo, pode-se mostrar redução da testosterona nos grupos tratados com o ginseng brasileiro.

Os níveis de testosterona plasmática estavam reduzidos nos grupos tratados com o ginseng brasileiro, porém no grupo Citrato de Sildenafil eles estavam aumentados. A testosterona é essencial para manter a espermatogênese em vários níveis. Na ausência de testosterona ou do receptor de andrógeno (AR), a formação da barreira da célula de Sertoli é comprometida, as células germinativas são incapazes de progredir na meiose, as células germinativas imaturas são prematuramente deslocadas das células de Sertoli e espermatozoides maduros não são liberados das células de Sertoli. A interrupção de qualquer uma destas etapas dependentes de testosterona resulta na falha da espermatogênese, o que pode levar à infertilidade (42).

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de estradiol. Embora a testosterona seja conhecida como um hormônio sexual dominante nos homens, o estradiol também é encontrado em níveis detectáveis e desempenha papel crítico na função sexual masculina (21). O estradiol é essencial na modulação da libido, função erétil e espermatogênese (21), porém uma relação testosterona/estradiol anormal está frequentemente associada à diminuição dos parâmetros espermáticos (43). Quando a testosterona está em excesso ela é convertida em estradiol através das aromatases (21), inibindo o eixo hipotálamo-hipófise e, subsequentemente, os hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), reduzindo assim a testosterona circulante(44–46).

Os grupos experimentais reagiram de duas formas: o grupo tratado com citrato de sildenafil mostrou aumento de testosterona e também de estradiol, justificado pela ação da aromatase na conversão do andrógeno em estrógeno (21); os animais tratados com o ginseng brasileiro apresentaram aumento do estradiol e redução da testosterona, possivelmente pelo efeito estrogênico da planta (20). Fitoestrógeno derivado do ginseng provocaram lesões nas células de Leydig interferindo na síntese de testosterona. Embora a redução de testosterona seja diretamente associada a baixa de libido em machos (47) o estrógeno tem função na sexualidade masculina, dentre elas a função erétil e libido (21). Estes dados corroboram os achados que homens com testosterona diminuída mantiveram o libido quando recebiam estradiol exógeno (48), e que animais castrados que recebiam estradiol, demonstraram atividade sexual de maneira dependente de dose e tempo (49), fazendo com que essa queda de testosterona, associada aos outros efeitos, não causasse dano a libido ou atividade sexual.

Observou-se aumento de NO no pênis dos animais tratados com o ginseng brasileiro e também com citrato de Sildenafil. Sabendo que os tratamentos com BGE,

assim como o citrato de Sildenafil, aumentaram percentual e volume de vasos sanguíneos e espaço linfático, e que o óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador (50), pode-se inferir que o NO foi a causa dessa alteração que tornou os vasos mais permeáveis, causando acúmulo de líquidos no espaço linfático, justificando assim aumento do peso testicular. O NO regula diversas funções fisiológicas, inclusive no controle da esteroidogênese (51). Porém, o aumento exacerbado desse radical pode promover desequilíbrio redox levando ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à morte celular (52–55).

Associado ao aumento de NO, o composto majoritário da planta 20-hidroxiecdisona (20E) induz o influxo de cálcio, ativando a caspase 3/7 que finalmente causa a morte da célula por apoptose (56). Possivelmente por esta razão as células de Leydig tenham morrido à medida que a dosagem aumentou. Além do efeito vasodilatador, o NO pode ser um supressor da testosterona controlando a síntese de andrógenos (57). Guo et al.(53) sugeriram que quantidades excessivas de NO pudessem inibir diretamente o cAMP, que medeia ação de gonadotrofina na conversão de colesterol em pregnenolona. A inibição de cAMP reduz o transporte de colesterol para a membrana interna das mitocôndrias, onde é convertido principalmente em pregnenolona, causando o acúmulo no citoplasma da célula de Leydig (58). Por esta razão houve aumento no percentual de citoplasma de Leydig, devido ao acúmulo de gotículas de gordura

Como vasodilatador, o NO se encaixa nos requisitos da fisiologia da ereção peniana. O aumento do NO peniano justifica o aumento dos corpos cavernosos observados nos grupos tratados. Os estímulos do fluxo de sangue que ocorrem no início da ereção coordenam o processo, que expande o espaço sinusoide aumentando a liberação do NO que, por sua vez, ativa a guanilato ciclase, aumentando o nível de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), produzindo relaxamento muscular e vasodilatação (19) provocando a ereção. A fosfodiesterase-5 degrada o cGMP inibindo a ereção. Assim, inibidores dessa enzima, que impedem a degradação do cGMP, são utilizados para manter a ereção por mais tempo (59).

A função erétil é uma combinação complexa de ações nervosas, vasculares e endócrinas, com fisiologia pouco descrita, que trabalham em conjunto como visto até agora, para produzir mudanças estruturais de forma coordenada. O músculo liso, o endotélio e as comunicações célula-célula através de junções gap são essenciais para a

ereção e, portanto, a patologia em qualquer um desses componentes pode levar a disfunção erétil (DE) (21).

Grupos tratados com o ginseng brasileiro mostraram aumento do percentual de colágeno I e redução no colágeno III, além de redução do músculo liso no pênis. Dentre as duas linhas que justificam esses dados, uma delas mostra que pessoas com DE apresentam redução no músculo liso e aumento de colágeno, alterando a estrutura peniana (60), sendo esta fibrose o estágio final da DE por reflexo de disfunção veno-oclusiva (61). Outra vertente explica que o colágeno garante força e tração ao tecido durante a ereção, e assim ele não teria relação direta com a DE, mas um papel importante no suporte, limitando os movimentos e protegendo de deformação durante ereção/detumescência (62). Quanto à redução do músculo liso, possivelmente o aumento do corpo cavernoso fez com que o músculo liso se distendesse ficando visivelmente diminuído nas laminais histológicas, sendo então pouco marcado nas colorações. Estes dados concordam com Figueiredo e colaboradores (63), eles afirmam que o aumento do músculo liso contribui para a disfunção erétil, pois reduz o espaço dos sinusoides e, portanto, diminui o fluxo de sangue.

Entendemos que os dados apresentados neste trabalho se encaixam no segundo caso. Apesar de embora a estrutura peniana apresentar alterações estruturais, os animais foram submetidos a acasalamento e não apresentaram problemas. Embora exista redução de testosterona e de músculo liso, o estradiol aumentado possivelmente manteve a libido e conseqüentemente o acasalamento. Tal fato já foi discutido e comentado por Schulster e colaboradores (21) onde fica evidente que homens que apresentam estrogênio elevado sustentam a libido mesmo com a testosterona baixa.

Desta forma as alterações no NO, estradiol, testosterona, músculo liso e no percentual de colágeno estão relacionadas com aumento dos corpos cavernosos nos animais tratados com ginseng brasileiro em doses altas, mostrando que o tratamento com a planta é capaz de causar relaxamento da musculatura vascular, aumentando o fluxo sanguíneo para os espaços lacunares. A testosterona também 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 (64,65). Estudos feitos com o *Panax ginseng* em coelhos machos mostraram efeitos semelhantes e atribuídos aos ginsenosídeos (5,66), também presentes em *P. glomerata*. Alguns estudos realizados demonstraram os efeitos de extratos vegetais ou de seus constituintes isolados

sobre a ereção peniana comprovaram sua ação sobre as células musculares vasculares, tendo um efeito relaxante melhorando o mecanismo da ereção (67–71). Assim, o músculo liso deve relaxar para manter a ereção, aumentando a pressão intracavernosa durante o processo (72).

Concluimos então que o tratamento com o extrato do ginseng brasileiro está relacionado com o aumento do NO, atuando sobre os vasos sanguíneos, favorecendo o fluxo de líquido para o espaço linfático acarretando aumento do peso testicular. Essa vasodilatação é vista também no pênis com o aumento dos corpos cavernosos, aumento de colágeno e redução de músculo liso peniano. O aumento dos níveis de estradiol interfere na capacidade de síntese da célula de Leydig que acumula gotículas de lipídios no seu citoplasma, o que pode estar associado à elevada mortalidade encontrada. Assim, o ginseng brasileiro tem ação afrodisíaca, porém com efeitos colaterais na produção de testosterona e na viabilidade das células de Leydig.

## REFERÊNCIAS

1. Matta APLF. Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos. 2012; p 93
2. Corrigan BM, Van Wyk BE, Geldenhuys CJ, Jardine JM. Ethnobotanical plant uses in the KwaNobela Peninsula, St Lucia, South Africa. *South African J Bot* 2011;77(2):346–59.
3. 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(4):445–50.
4. Chauhan NS, Sharma V, Dixit VK, Thakur M. A review on plants used for improvement of sexual performance and virility. *Biomed Res Int* 2014; 2014.
5. Ho CCK, Tan HM. Rise of herbal and traditional medicine in erectile dysfunction management. *Curr Urol Rep* 2011;12(6):470–8.
6. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: 2002.
7. Teske M, Trentini AM. Herbarium: compêndio de fitoterapia. In: Herbarium Laboratório botânico. Curitiba: 2001. p. 317.
8. Nicoloso F, Fortunato R, Fogaça M. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. *Ciência Rural* 1999;29(2):277–81.
9. Singh R, Ali A, Jeyabalan G, Semwal A. Current status of Indian medicinal plants with aphrodisiac potential. *J Acute Dis* 2013; 2(1):13–21. 10.
10. Sandroni P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. *Clin Auton Res* 2001; 11(1):303–7.
11. Chaturapanich G, Chaiyakul S, Verawatnapakul V, Pholpramool C. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatid blood flow in male rats. *Reproduction* 2008; 136(4):515–22.

12. Zamblé A, Martin-Nizard F, Sahpaz S, Hennebelle T, Staels B, Bordet R, et al. Vasoactivity, antioxidant and aphrodisiac properties of *Caesalpinia benthamiana* roots. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(1):112–9.
13. Malviya N, Jain S, Gupta VB, Vyas S. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction - A review. *Acta Pol Pharm - Drug Res* 2011; 68(1):3–8.
14. Patel DK, Kumar R, Prasad SK, Hemalatha S. Pharmacologically screened aphrodisiac plant-A review of current scientific literature. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 1:131–8.
15. Luke, MC; Coffey DS. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: KNOBIL E, editor. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994. p. 1435–88.
16. Fan X, Robaire B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* 1998;139(4):2128–36.
17. Teixeira CGL, Piccoli A, Costa P, Soares L, da Silva-Santos JE. Involvement of the nitric oxide/soluble guanylate cyclase pathway in the anti-oedematogenic action of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen in mice. *J Pharm Pharmacol* 2006;58(5):667–75.
18. Freitas CS, Baggio CH, Da Silva-Santos JE, Rieck L, Santos CADM, Júnior CC, et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sci* 2004;74(9):1167–79.
19. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido Nítrico: Revisão. *Acta Cir Bras* 2002;17(6):417–23.
20. Taylor L. *Herbal Secrets of the Rainforest : Over 50 Powerful Herbs and Their Medicinal Uses*. Prima Health pub; 1998.
21. Schulster M, Bernie A, Ramasamy R. The Role of Estradiol in Male Reproductive Function. *Asian J Androl* 2016; 18:1–6.
22. Fan Chung K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2006; 533(1–3):110–7.
23. Ückert S, Oelke M, Stief CG, Andersson KE, Jonas U, Hedlund P. Immunohistochemical distribution of cAMP- and cGMP-phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human prostate. *Eur Urol* 2006; 49(4):740–5.

24. Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED, editors. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Florida: 1990. p. 1–40a.
25. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965; 27(15):137.
26. Amann R. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertil Steril* 1970; 21:662–72.
27. 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; 25:217–26.
28. Costa KLC, Da Matta SLP, de Lucca Moreira Gomes M, de Paula TAR, de Freitas KM, de Araújo Resende Carvalho F, et al. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim Reprod Sci* 2011;127(3–4):202–12.
29. Giri BR, Roy B. *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. *Parasitol Res* 2016; 2617–2624
30. Bai Aswathanarayan J, Rai Vittal R, Muddegowda U. Anticancer activity of metal nanoparticles and their peptide conjugates against human colon adenorectal carcinoma cells. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* 2017;0(0):1–8.
31. Weiss DA, Rodriguez E, Cunha T, Menshenina J, Barcellos D, Chan LY, et al. Morphology of the external genitalia of the adult male and female mice as an endpoint of sex differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 354(1–2):94–102.
32. Yang JH, Menshenina J, Cunha GR, Place N, Baskin LS. Morphology of Mouse External Genitalia: Implications for a Role of Estrogen in Sexual Dimorphism of the Mouse Genital Tubercle. *J Urol*. 2012; 184:1604–9.
33. Phillips TR, Wright DK, Gradie PE, Johnston LA, Pask AJ. *A Comprehensive Atlas of the Adult Mouse Penis*. *Sex Dev* 2015;9(3):162–72.

34. Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 2002; 6(2):178–85.
35. SINGH D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. *Indian J Genet e Plant Breed* 1981; 41:237–45.
36. CRUZ CD. Programa Genes - Diversidade Genética. 1st ed. Viçosa: UFV; 2008.
37. Witte MH, Jones K, Wilting J, Dictor M, Selg M, McHale N, et al. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(2):159–84.
38. Hirai S, Naito M, Terayama H, Ning Q, Miura M, Shirakami G, et al. Difference in abundance of blood and lymphatic capillaries in the murine epididymis. *Med Mol Morphol* 2010; 43(1):37–42.
39. Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Kuerban M, Musha M, et al. The origin of lymphatic capillaries in murine testes. *J Androl* 2012; 33(4):745–51.
40. Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 1973;9(5):500–32.
41. Russell LD. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russell LD, editor. *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press; 1996. p. 218–22.
42. Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 2005;130(1):15–28.
43. De Paula TAR, Da Matta SLP, Da Silva VA, Costa DS, Fonseca CC, Das Neves MTD. Interbular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Brazilian Arch Biol Technol* 2007; 50(2):289–97.
44. Santen RJ. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest* 1975; 56(6):1555–63.
45. Marshall JC, Case GD, Valk TW, Corley KP, Sauder SE, Kelch RP. Selective inhibition of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol. Mechanism for modulation of gonadotropin responses to low dose pulses of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Invest* 1983; 71(2):248–57.
46. Bagatell J, Bremner J. Mediated by Aromatization to Estradiol to Inhibit absent. *Society* 1994; 15(1).

47. Travison TG, Morley JE, Araujo AB, O'Donnell AB, McKinlay JB. The relationship between libido and testosterone levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(7):2509–13.
48. Wibowo E, Schellhammer P, Wassersug RJ. Role of Estrogen in Normal Male Function: Clinical Implications for Patients with Prostate Cancer on Androgen Deprivation Therapy. *J Urol* 2011; 185(1):17–23.
49. Davidson JM, Allinson PA. Effects of Estrogen on the Sexual Behavior of Male Rats. *Endocrinology* 1969; 84:1365–72.
50. Luna-Vázquez FJ, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Rojas-Molina I, Zavala-Sánchez MÁ. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. *Molecules* 2013; 18(5):5814–57.
51. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994; 266:829–39.
52. Lee M-H, Jang M-H, Kim E-K, Han S-W, Cho S-Y, Kim C-J. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci* 2005; 97(3):369–76.
53. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51(3):443–52.
54. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol e Med Lab* 2003; 39:343–50.
55. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000;73(3):459–64.
56. Wang D, Pei XY, Zhao WL, Zhao XF. Steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes higher calcium mobilization to induce apoptosis. *Cell Calcium* 2016;60(1):1–12.
57. Dobashi M, Fujisawa M, Yamazaki T, Okuda Y, Kanzaki M, Tatsumi N, et al. Inhibition of steroidogenesis in Leydig cells by exogenous nitric oxide occurs independently of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mRNA. *Syst Biol Reprod Med* 2001; 47(3):203–9.
58. Guo CH, Lin CY, Yeh MS, Hsu GSW. Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 19(1):33–40.

59. Corbin JD, Francis SH, Webb DJ. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology* 2002; 60:4–11.
60. Wespes ADSE. Objective measurement of the different collagen types in the corpus cavernosum of potent and impotent men: an immunohistochemical staining with computerized-image analysis. *World J Urol* 1997; 50–5.
61. Pinheiro ACAD, Costa WS, Cardoso LEM, Sampaio FJB. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol* 2000;164(5):1802–6.
62. Luangkhot R, Rutchik S, Agarwal V, Puglia K, Bhargava G, Melman A. Collagen alterations in the corpus cavernosum of men with sexual dysfunction. *J Urol* 1992;148(2 Pt 1):467–71.
63. Abidu-Figueiredo M, Ribeiro IC, Chagas MA, Cardoso LEM, Costa WS, Sampaio FJB. The penis in diabetes: Structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. *BJU Int* 2011;108(3):400–4.
64. Traish AM. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: A review. *J Androl* 2009; 30(4):363–9.
65. Castela A, Vendeira P, Costa C. Testosterone, Endothelial Health, and Erectile Function. *ISRN Endocrinol* 2011; 2011:1–7.
66. Chen X, Lee TJ-F. Ginsenosides-induced nitric oxide-mediated relaxation of the rabbit corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* 1995; 115(1):15–8.
67. Chen J, Chiou WF, Chen CC, Chen CF. Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro. *J Urol* 2000; 163(6):1975–80.
68. Kim HK, Bak YO, Choi BR, Zhao C, Lee HJ, Kim CY, et al. The role of the lignan constituents in the effect of *Schisandra chinensis* fruit extract on penile erection. *Phytother Res* 2011; 25(12):1776–82.
69. Abdelwahab SI, Mohamed AH, Mohamed OY, Oall M, Taha MME, Mohan S, et al. Erectogenic effects of *Clerodendron capitatum*: Involvement of phosphodiesterase type-5 inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012:16–8.
70. Li X, Oh HC, Son S Bin, Lee YJ, Kang DG, Lee HS. Effect of an ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* on relaxation in corpus cavernosum smooth muscle. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012.

71. Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 2005; 32(4):379–95.
72. Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJB. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int* 2006;567–9.

**Tabela 1.** Parâmetros biométricos, corporal e testicular, de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE).

	<b>Controle</b>	<b>Citrato de Sildenafil</b>	<b>BGE 100mg/kg</b>	<b>BGE 200mg/kg</b>	<b>BGE 400mg/kg</b>	<b>BGE 200mg/kgD</b>
Peso corporal(g)	37.28±0,38 <sup>a</sup>	39,27±4,93 <sup>a</sup>	41,34±3,88 <sup>a</sup>	41,2±3,19 <sup>a</sup>	42,13±2,07 <sup>a</sup>	35,32±0,86 <sup>a</sup>
Peso testicular (g)	0,195±0,04 <sup>a</sup>	0,230±0,02 <sup>ab</sup>	0,239±0,02 <sup>ab</sup>	0,246±0,03 <sup>ab</sup>	0,257±0,04 <sup>b</sup>	0,264±0,01 <sup>b</sup>
IGS (%)	0,52±0,11 <sup>a</sup>	0,60±0,11 <sup>a</sup>	0,58±0,07 <sup>ab</sup>	0,60±0,06 <sup>ab</sup>	0,61±0,10 <sup>a</sup>	0,75±0,04 <sup>b</sup>
Peso epidídimo	0,066 ±0,0067 <sup>a</sup>	0,051±0,0081 <sup>a</sup>	0,050±0,0045 <sup>b</sup>	0,058±0,0162 <sup>a</sup>	0,061±0,0034 <sup>a</sup>	0,043±0,0032 <sup>b</sup>
Peso relativo epidídimo	0,157±0,0160 <sup>a</sup>	0,129±0,0198 <sup>b</sup>	0,119±0,0130 <sup>b</sup>	0,151±0,0275 <sup>a</sup>	0,160±0,0107 <sup>a</sup>	0,123±0,0077 <sup>b</sup>
Peso próstata	0,180±0,0226 <sup>a</sup>	0,155±0,0262 <sup>a</sup>	0,164±0,0249 <sup>a</sup>	0,157±0,0162 <sup>a</sup>	0,174±0,0170 <sup>a</sup>	0,139±0,0084 <sup>b</sup>
Peso relative prostate	0,429±0,0539 <sup>a</sup>	0,388±0,0641 <sup>a</sup>	0,395±0,0533 <sup>a</sup>	0,413±0,0579 <sup>a</sup>	0,452±0,0428 <sup>a</sup>	0,395±0,0271 <sup>a</sup>
Peso vesicular seminal	0,369±0,0535 <sup>a</sup>	0,318±0,0624 <sup>a</sup>	0,313±0,0599 <sup>a</sup>	0,239±0,0270 <sup>b</sup>	0,262±0,0257 <sup>b</sup>	0,246±0,0232 <sup>b</sup>
Peso relativo vesicular seminal	0,878±0,1272 <sup>a</sup>	0,797±0,1518 <sup>a</sup>	0,753±0,1337 <sup>a</sup>	0,638±0,0763 <sup>b</sup>	0,681±0,0738 <sup>a</sup>	0,699±0,0723 <sup>a</sup>

IGS – Índice gonadossomático. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

**Tabela 2:** Percentual e volume dos componentes do intertúbulo de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE).

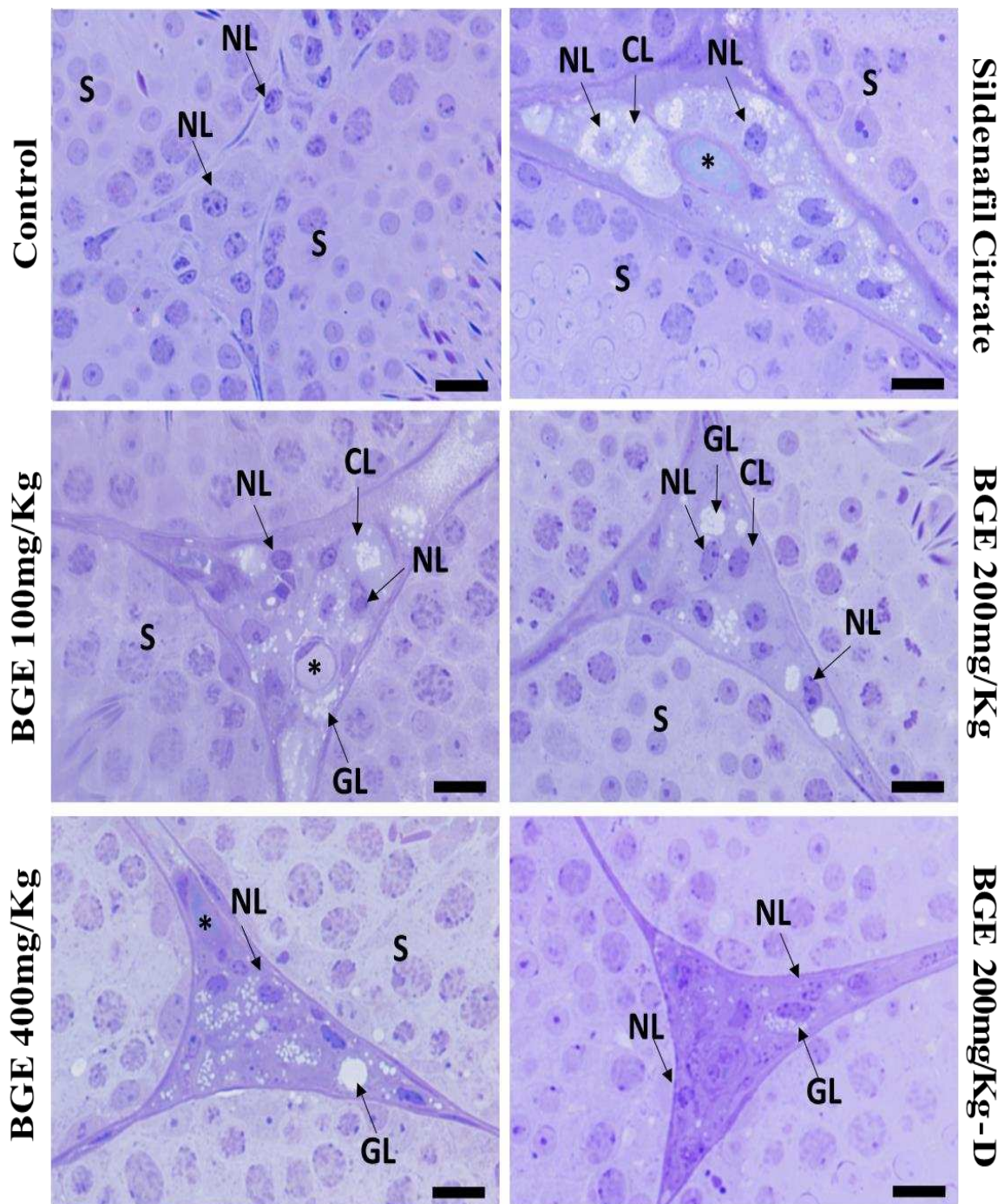
	Control	Sildenafil citrate	100mg/kg HRPB	200mg/kg BGE	400mg/kg HRPB	200mg/kgBGE- D
Intertúbulo (%)	6,84±0,94 <sup>a</sup>	9,61±1,79 <sup>b</sup>	10,97±1,17 <sup>cb</sup>	10,48±1,29 <sup>cb</sup>	10,22±0,93 <sup>cb</sup>	8,21±0,91 <sup>ab</sup>
Vaso sanguíneo (%)	0,59±0,3 <sup>a</sup>	0,47±0,3 <sup>a</sup>	1,90±0,7 <sup>b</sup>	0,62±0,2 <sup>a</sup>	0,65±0,3 <sup>a</sup>	2,31±1,4 <sup>b</sup>
Espaço Linfático (%)	0,45±1,04 <sup>a</sup>	1,22±0,41 <sup>a</sup>	2,66±1,24 <sup>b</sup>	0,75±0,87 <sup>a</sup>	2,35±0,93 <sup>b</sup>	1,97±0,97 <sup>b</sup>
Núcleo de Leydig (%)	0,67±0,2 <sup>a</sup>	1,33±0,2 <sup>b</sup>	1,20±0,7 <sup>a</sup>	1,34±0,2 <sup>b</sup>	1,10±0,7 <sup>b</sup>	0,72±0,8 <sup>a</sup>
Citoplasma de Leydig (%)	4,06±0,5 <sup>a</sup>	6,44±1,3 <sup>b</sup>	6,26±1,6 <sup>b</sup>	6,29±1,2 <sup>b</sup>	6,46±1,3 <sup>b</sup>	3,99±0,4 <sup>a</sup>
Leydig (%)	4,74±0,7 <sup>a</sup>	7,77±1,7 <sup>b</sup>	7,4 ±0,7 <sup>b</sup>	7,64±1,4 <sup>b</sup>	7,92±1,2 <sup>b</sup>	4,73±0,5 <sup>a</sup>
Tecido Conjuntivo (%)	0,21±0,1 <sup>a</sup>	0,27±0,1 <sup>ab</sup>	0,22±0,1 <sup>a</sup>	0,44±0,1 <sup>b</sup>	0,50±0,2 <sup>b</sup>	0,42±0,1 <sup>b</sup>
Macrófago (%)	0,02±0,011 <sup>a</sup>	0,04±0,014 <sup>a</sup>	0,04±0,035 <sup>a</sup>	0,03±0,016 <sup>a</sup>	0,26±0,020 <sup>a</sup>	0,03±0,016 <sup>a</sup>
Intertúbulo (mL)	0,006±0,001 <sup>a</sup>	0,009±0,001 <sup>b</sup>	0,012±0,002 <sup>c</sup>	0,012±0,002 <sup>c</sup>	0,010±0,002 <sup>b</sup>	0,007 ±0,00 <sup>b</sup>
Vaso sanguíneo (mL)	0,00108 ±0,00040 <sup>a</sup>	0,00091±0,00044 <sup>a</sup>	0,00455±0,00179 <sup>b</sup>	0,00146±0,00051 <sup>a</sup>	0,00154±0,00072 <sup>a</sup>	0,0048±0,00081 <sup>b</sup>
Espaço Linfático (mL)	0,00085±0,00036 <sup>a</sup>	0,00246±0,00068 <sup>a</sup>	0,00627±0,00168 <sup>b</sup>	0,00173±0,00045 <sup>a</sup>	0,00531±0,00106 <sup>b</sup>	0,00474±0,00219 <sup>b</sup>
Núcleo de Leydig (mL)	0,00131±0,00060 <sup>a</sup>	0,00264±0,00072 <sup>b</sup>	0,00287±0,00062 <sup>b</sup>	0,00310±0,00047 <sup>b</sup>	0,00259±0,00085 <sup>b</sup>	0,00171±0,00025 <sup>a</sup>
Citoplasma de Leydig (mL)	0,00785±0,00222 <sup>a</sup>	0,01269±0,00181 <sup>a</sup>	0,01495±0,00478 <sup>b</sup>	0,01477±0,00353 <sup>b</sup>	0,01501±0,00384 <sup>b</sup>	0,00951±0,00113 <sup>a</sup>
Leydig (mL)	0,00887 ±0,00257 <sup>a</sup>	0,01521±0,00252 <sup>b</sup>	0,01773±0,00522 <sup>b</sup>	0,01832±0,00390 <sup>b</sup>	0,01644±0,00382 <sup>b</sup>	0,00983 ±0,00127 <sup>a</sup>
Tecido Conjuntivo (mL)	0,00042±0,00021 <sup>a</sup>	0,00054±0,00010 <sup>a</sup>	0,00053±0,00015 <sup>a</sup>	0,00102±0,00027 <sup>b</sup>	0,00115±0,00039 <sup>b</sup>	0,00102±0,00018 <sup>b</sup>
Macrófago (mL)	0,00003±0,00002 <sup>a</sup>	0,00007±0,00003 <sup>a</sup>	0,00009±0,00008 <sup>a</sup>	0,00008±0,00005 <sup>a</sup>	0,00006±0,00006 <sup>a</sup>	0,00007±0,00003 <sup>a</sup>

Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

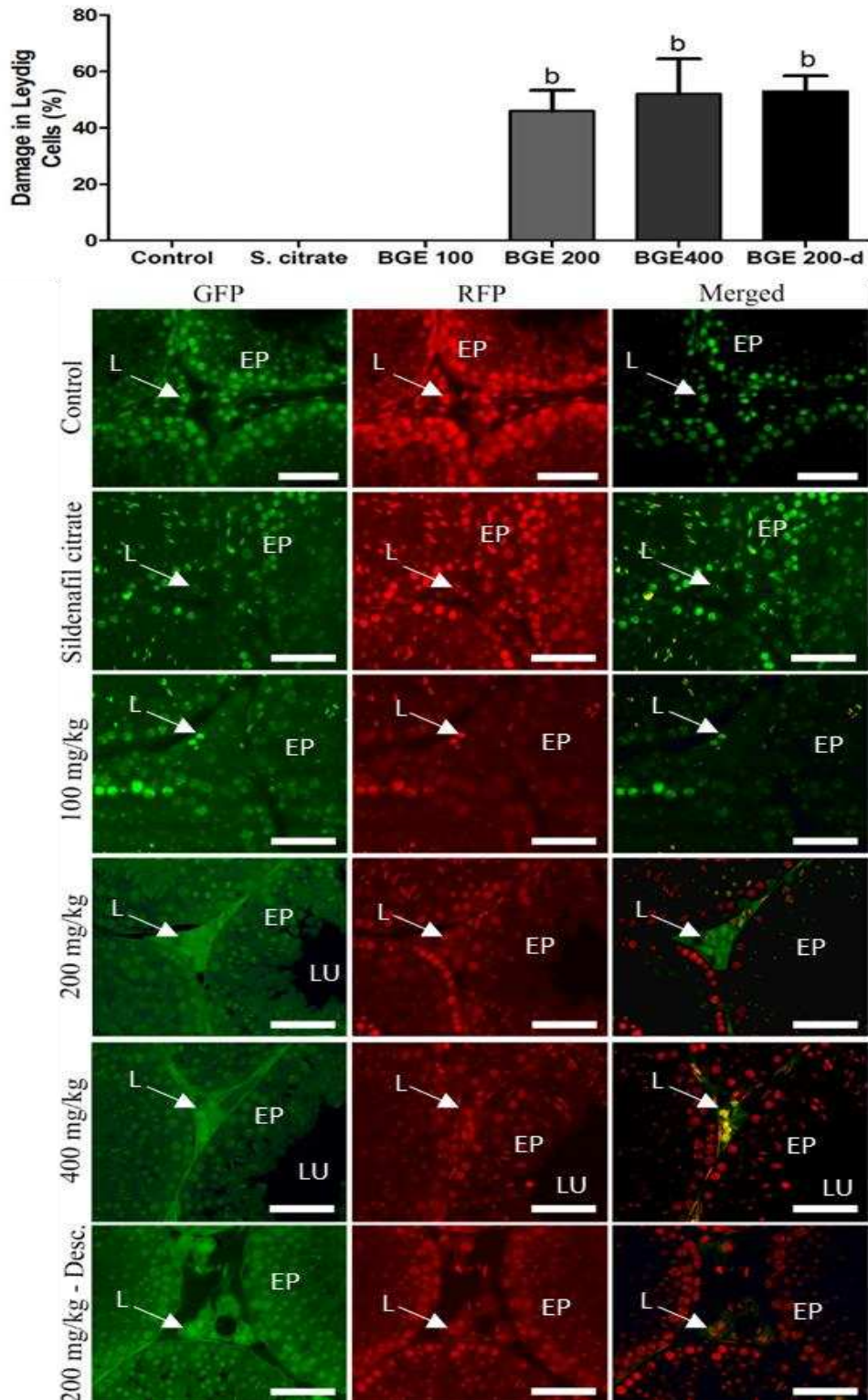
**Tabela 3:** Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE).

	Control	Sildenafil citrate	100mg/kg HRPG	200mg/kg BGE	400mg/kg HRPG	200mg/kgBGE- D
Diâmetro Nuclear de Leydig( $\mu\text{m}^3$ )	6,60 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	6,41 $\pm$ 2,18 <sup>a</sup>	7,12 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	8,44 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	3,92 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	6,53 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>
Volume do Núcleo de Leydig( $\mu\text{m}^3$ )	177,18 $\pm$ 34,4 <sup>a</sup>	205,71 $\pm$ 129,7 <sup>a</sup>	202,16 $\pm$ 149, 9 <sup>a</sup>	273,93 $\pm$ 64,9 <sup>a</sup>	32,68 $\pm$ 13,1 <sup>b</sup>	141,95 $\pm$ 28,9 <sup>a</sup>
Volume do citoplasma e Leydig( $\mu\text{m}^3$ )	1171,0 $\pm$ 422,2 <sup>a</sup>	1055,1 $\pm$ 747,3 <sup>a</sup>	982,73 $\pm$ 735,9 <sup>a</sup>	1329,1 $\pm$ 463,2 <sup>a</sup>	192,07 $\pm$ 81,1 <sup>b</sup>	787,04 $\pm$ 145,1 <sup>a</sup>
Volume de célula de Leydig( $\mu\text{m}^3$ )	1348,2 $\pm$ 447,70 <sup>a</sup>	1260,8 $\pm$ 762, 30	1184,9 $\pm$ 884, 80 <sup>a</sup>	1603,0 $\pm$ 525,4 <sup>a</sup>	224,76 $\pm$ 92,2 <sup>b</sup>	928,99 $\pm$ 167,5 <sup>a</sup>
Volume de Leydig/ t ( $\times 10^6$ )	9160,21 $\pm$ 2765,91 <sup>a</sup>	15329,12 $\pm$ 2521,16 <sup>b</sup>	17822,89 $\pm$ 5218,84 <sup>b</sup>	178707,0 $\pm$ 3898,51 <sup>b</sup>	18433,03 $\pm$ 816,15 <sup>b</sup>	11273,08 $\pm$ 1272,01 <sup>a</sup>
Volume de Leydig/ gt ( $\times 10^6$ )	44586,44 $\pm$ 7047,35 <sup>a</sup>	70805,73 $\pm$ 15282,89 <sup>b</sup>	69561,54 $\pm$ 14039,30 <sup>b</sup>	72402,15 $\pm$ 12366,87 <sup>b</sup>	69396,16 $\pm$ 7316,79 <sup>b</sup>	43300,21 $\pm$ 3857,26 <sup>a</sup>
Número de célula de Leydig / t ( $\times 10^6$ )	7,87 $\pm$ 4,20 <sup>a</sup>	13,49 $\pm$ 3,93 <sup>a</sup>	34,98 $\pm$ 36,33 <sup>a</sup>	11,66 $\pm$ 2,06 <sup>a</sup>	92,96 $\pm$ 37,29 <sup>b</sup>	12,56 $\pm$ 3,19 <sup>a</sup>
Número de célula de Leydig / gt ( $\times 10^6$ )	37,04 $\pm$ 15,25 <sup>a</sup>	66,52 $\pm$ 13,50 <sup>a</sup>	127,55 $\pm$ 12,62 <sup>a</sup>	48,57 $\pm$ 13,45 <sup>a</sup>	357,39 $\pm$ 166,12 <sup>b</sup>	47,99 $\pm$ 10,34 <sup>a</sup>
Índice Leydigossomático (%)	0,024 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,039 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,042 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>	0,045 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>	0,039 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>	0,028 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>

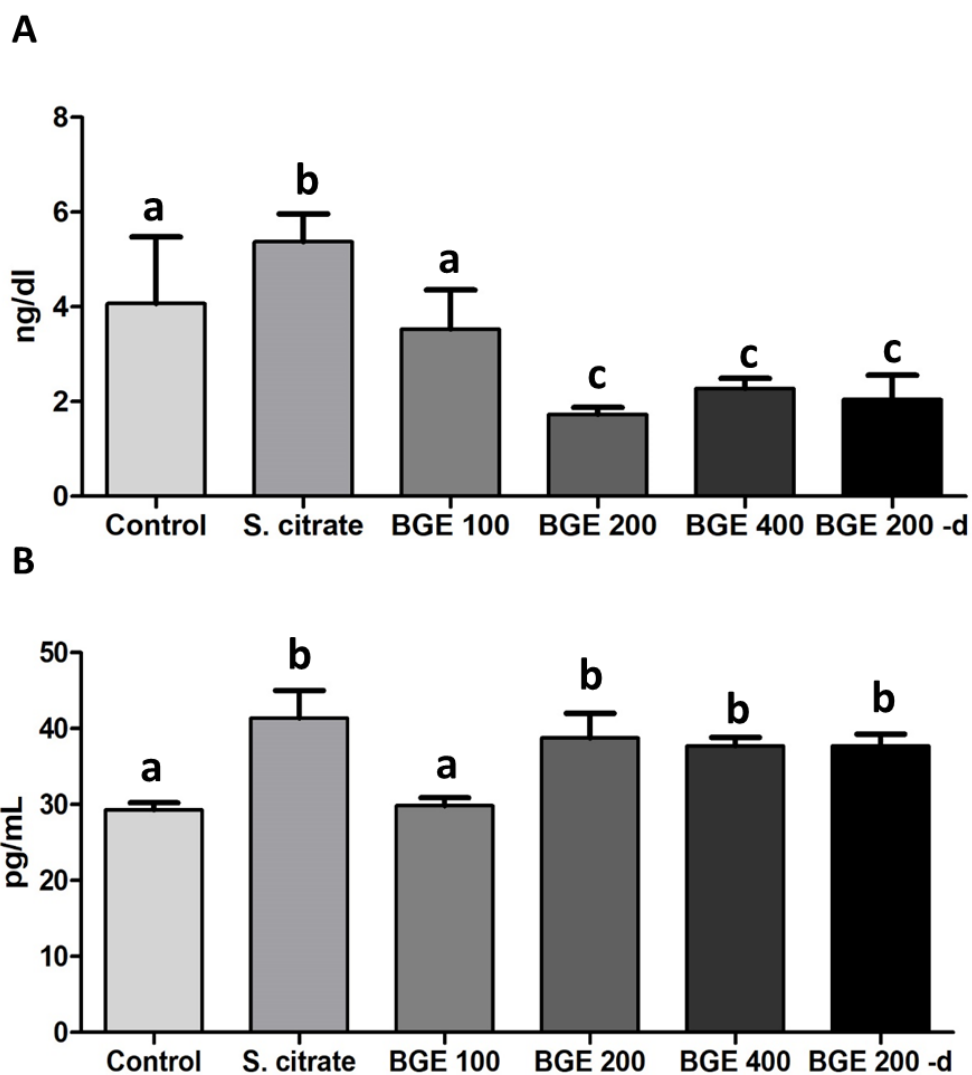
Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). Dados expressos como média $\pm$ DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).



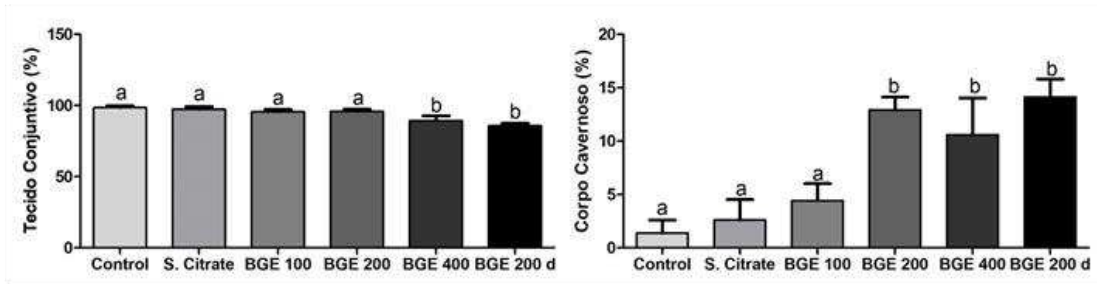
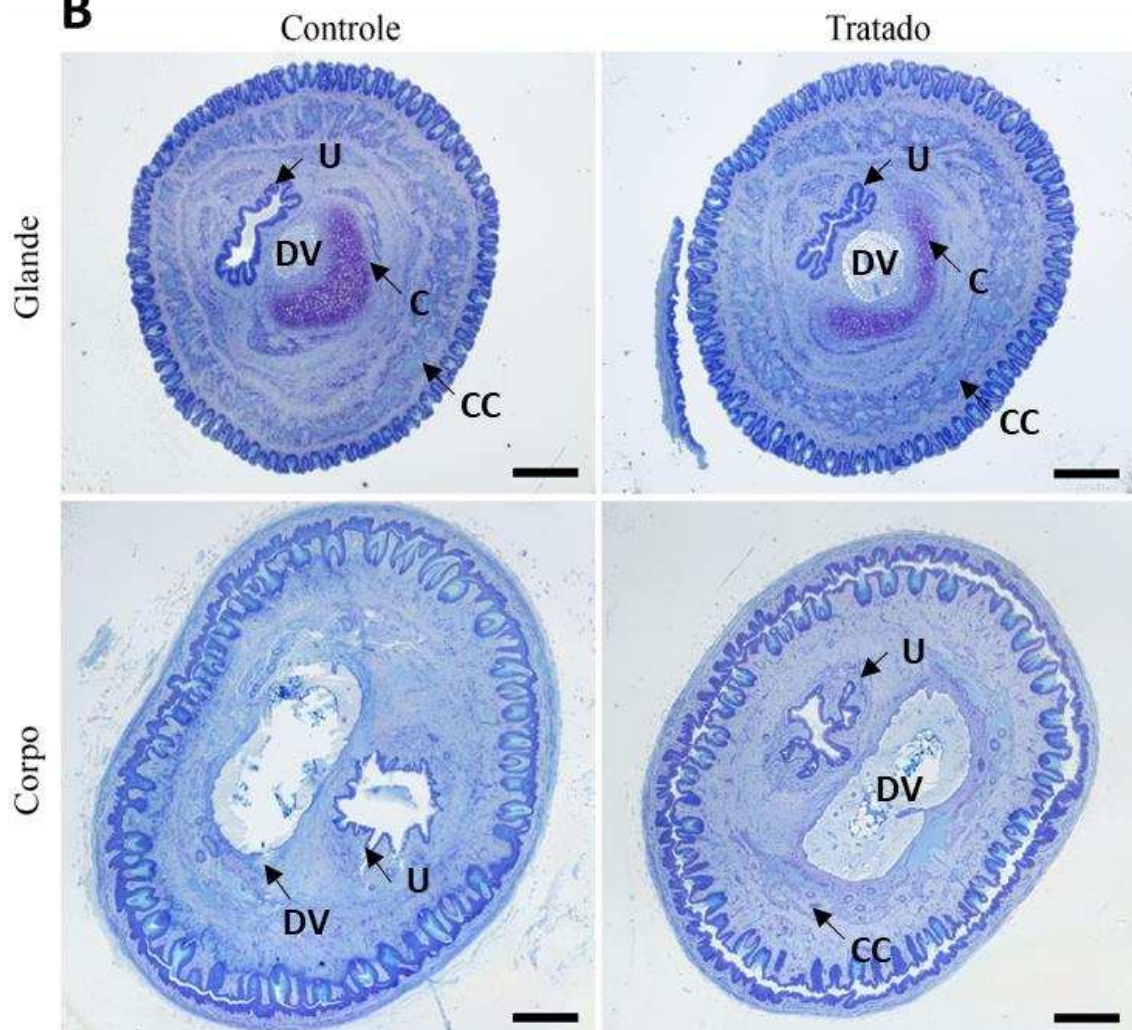
**Figura 1:** Secção histológica de testículo de animais tratados com extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). CL – Citoplasma de Leydig; NL- Núcleo de Leydig; \*- vaso sanguíneo; GL- Gotículas de lipídios; S – Epitélio seminífero. Corte de 2  $\mu$ m corados com HE/Azul de toluidina. Barra=50 $\mu$ m.



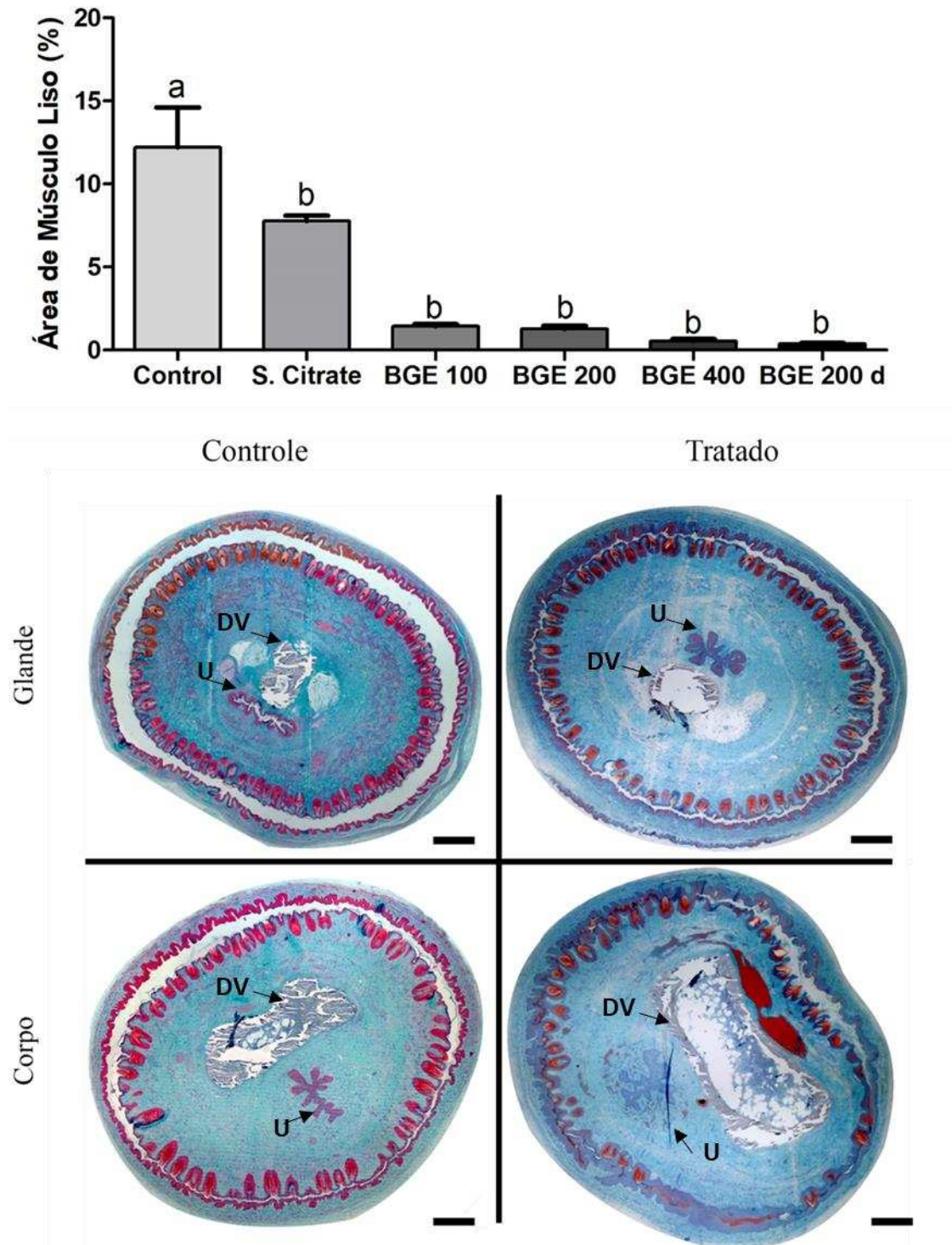
**Figura 2:** A - Percentual de células mortas; B- Secção histológica de testículo de animais tratados com extrato hidroalcolico de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE). Laranja de acridina e Iodeto de propídio, dupla marcação para detecção de morte celular. Filtro GFP (50 nm); Filtro RFP (580nm); Merged (Sobreposição das imagens); Merged´ - ampliação do Merged. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d). Ep – epitélio; LU- Lume; L – Leydig; núcleos verdes - Células viáveis; Núcleos amarelos - células com processo inicial de morte; Núcleos vermelhos- Células mortas. Barra=50µm.



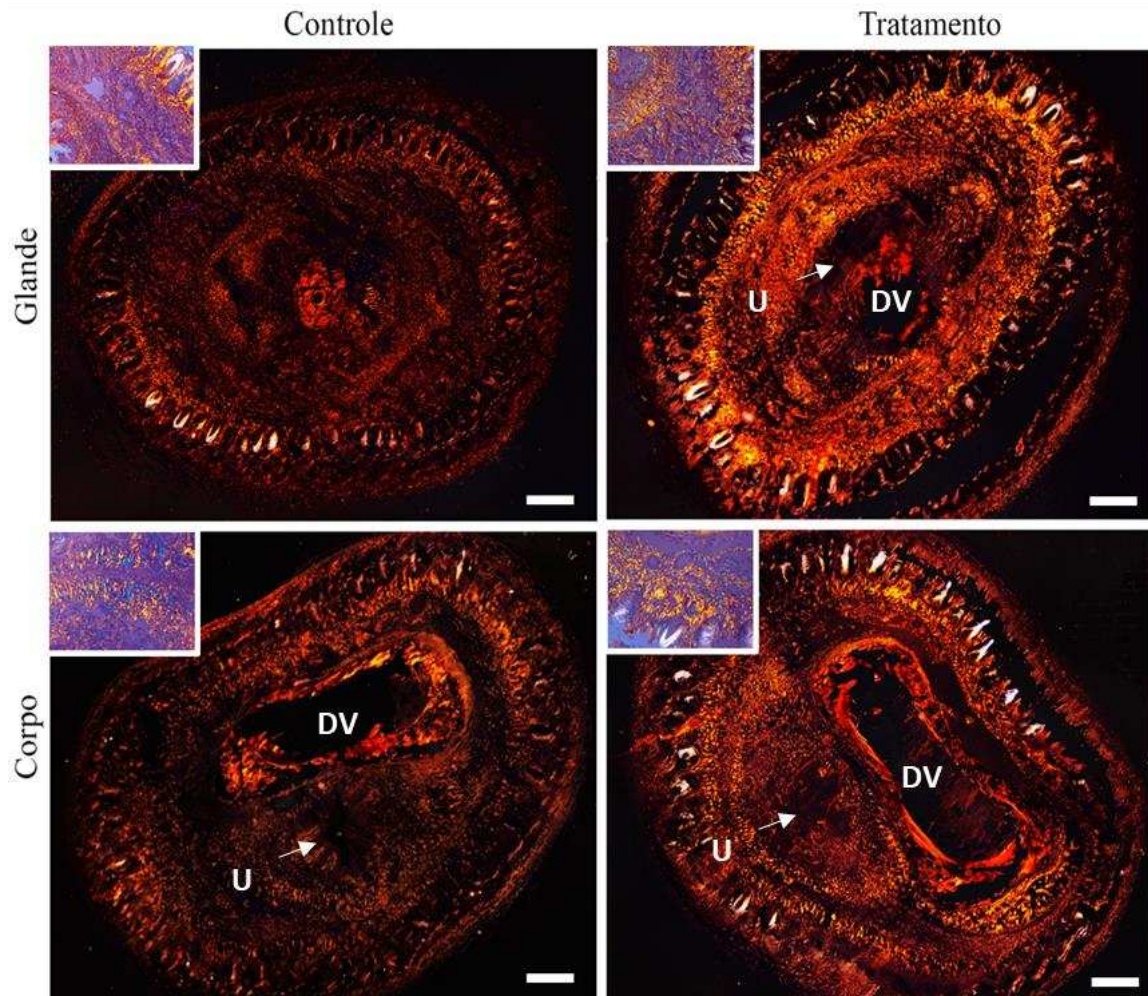
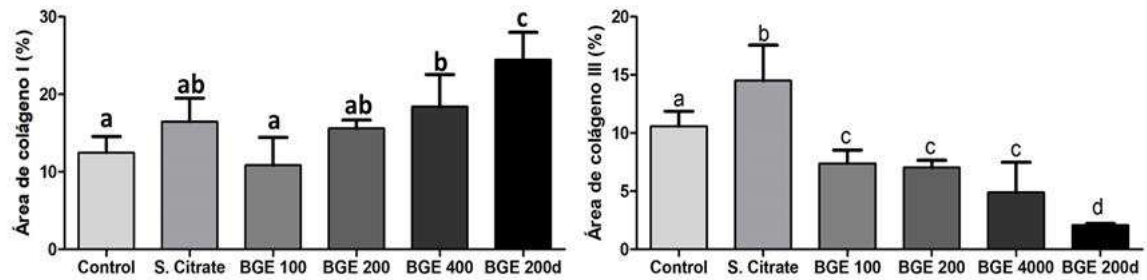
**Figura 3:** A - Concentração de testosterona; B - Concentração de 17  $\beta$  estradiol sérica de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kgD (doses descontinuas de BGE 3-3d).

**A****B**

**Figura 4:**A - Proporção de corpos cavernosos e tecido conjuntivo no pênis; B- Secção histológica de pênis de animais tratados com extrato hidroalcolico de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d). U – Uretra; DV – Vaso dorsal; CC- Corpo cavernoso; C-Cartilagem.Corte de 2 µm corados com HE/Azul de toluidina. Barra = 200 µm.

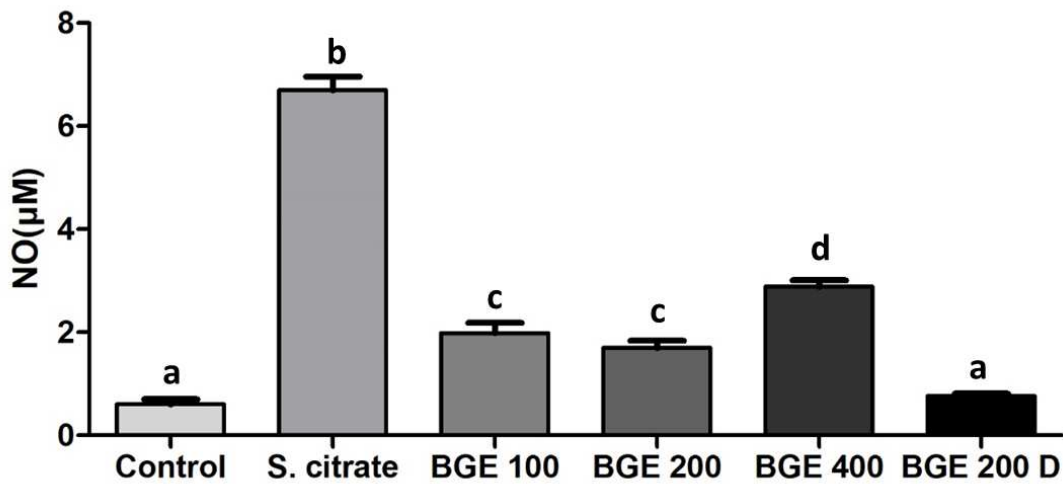


**Figura 5:**A - Proporção de Músculo liso no pênis; B- Secção histológica de pênis de animais tratados com extrato hidroalcolico de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d). U – Uretra; DV – Vaso dorsal. Corte de 2  $\mu$ m corados com Tricrômico de Gomori. Barra = 200  $\mu$ m.

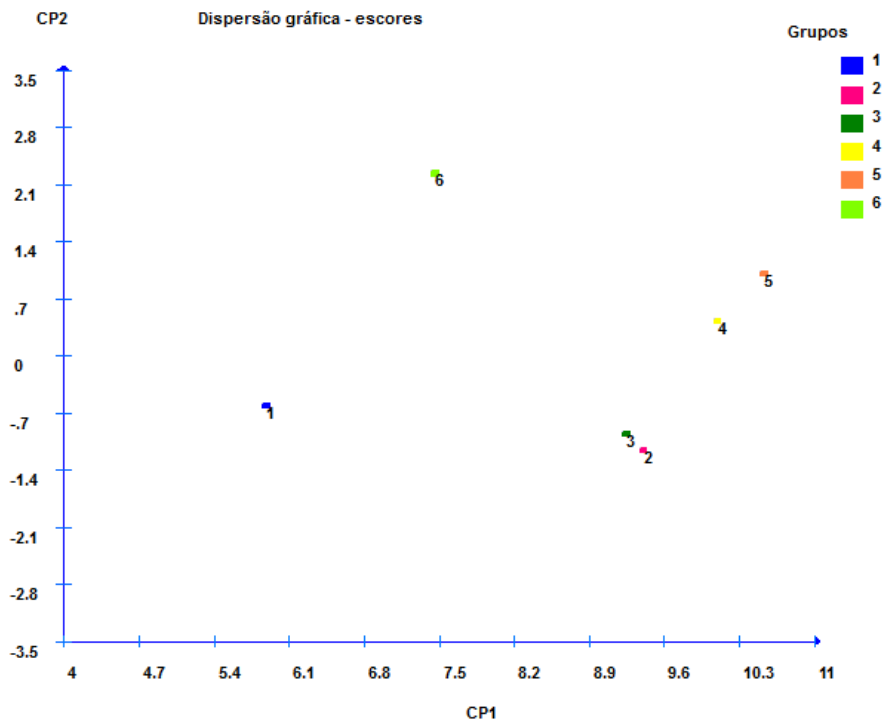


**Figura 6:**A –quantificação de colágeno I; B- Quantificação de colágeno III; C- Secção histológica de pênis de animais tratados com extrato hidroalcolico de *Pfaffia glomerata* (extrato do ginseng brasileiro – BGE). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg

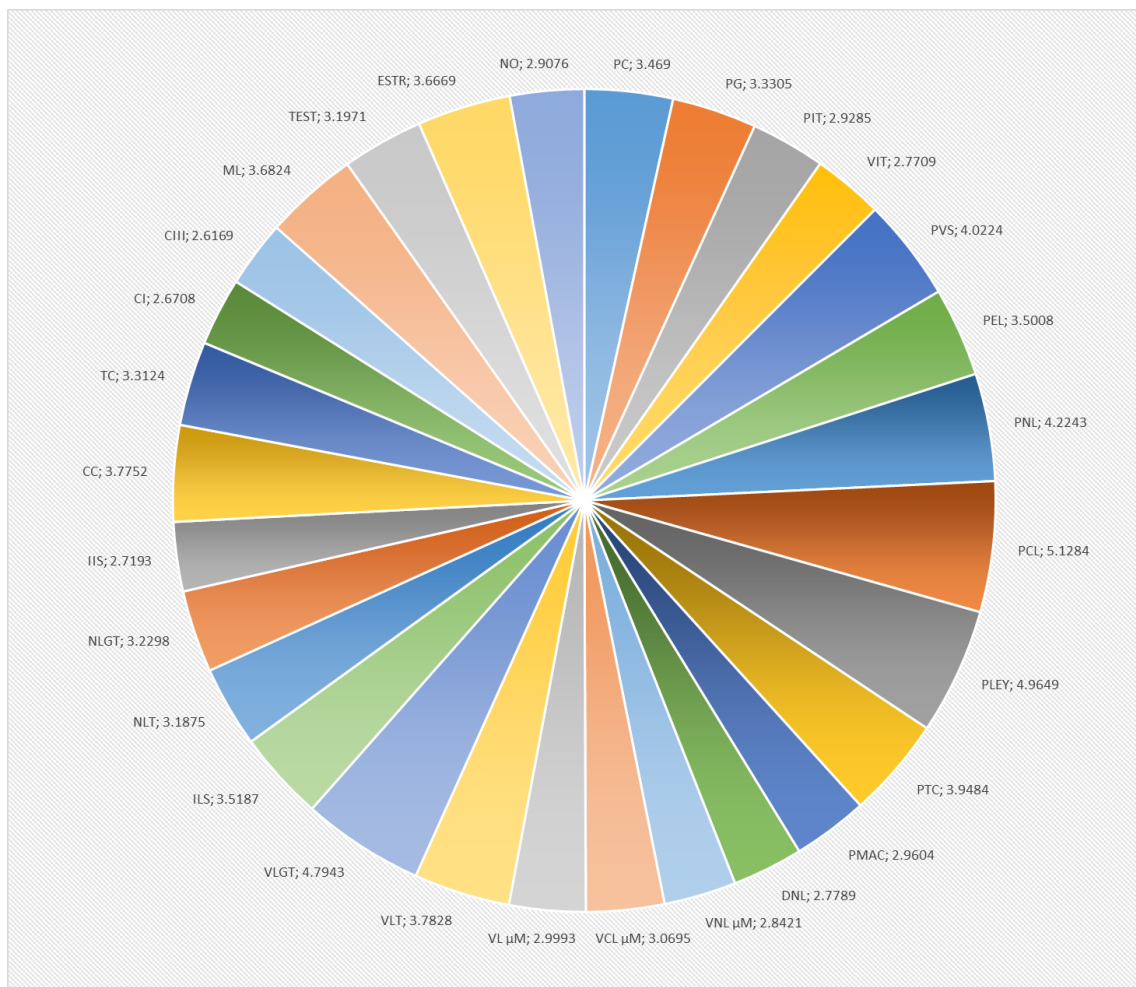
(Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d). No detalhe Fotomicrografia no aumento de 400x evidenciando as fibras de colágeno I (amarelo/vermelho) e III (verde/azul). U – Uretra; DV – Vaso dorsal. Corte de 2  $\mu$ m corados com Picosirius red. Barra = 200  $\mu$ m.



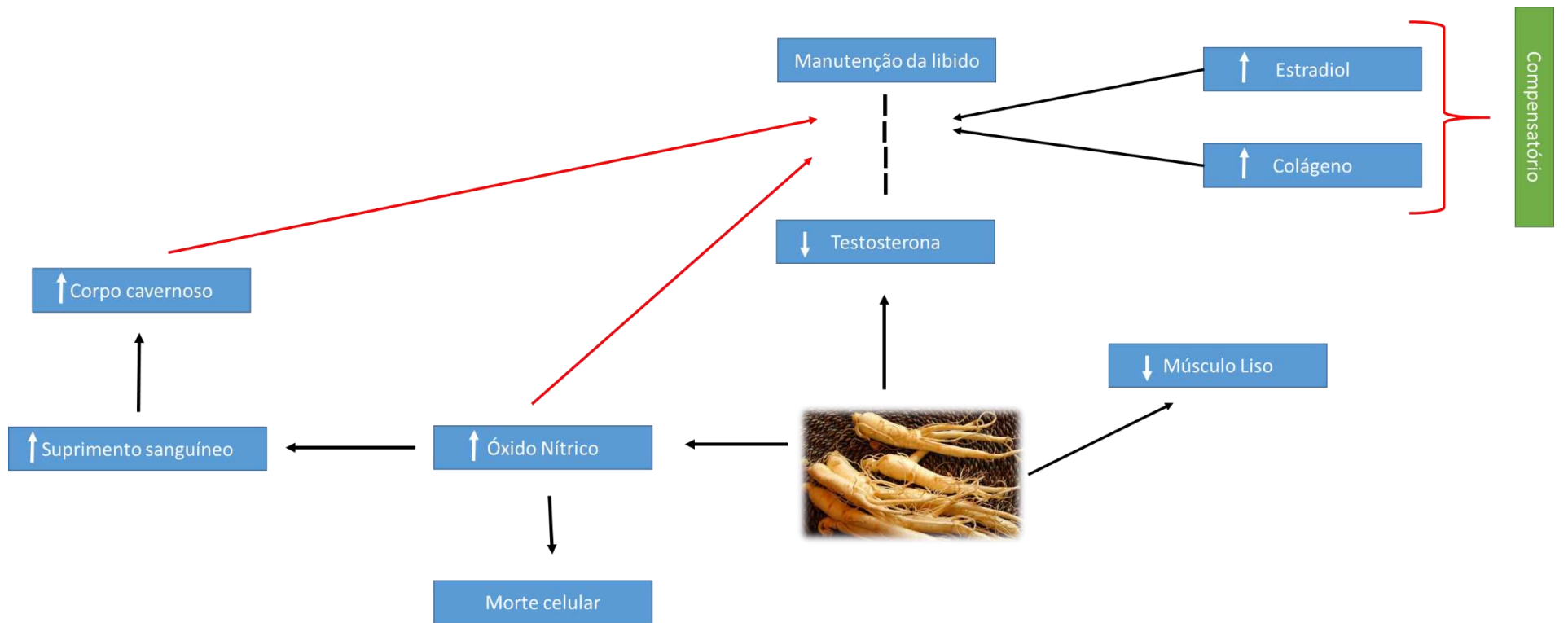
**Figura 7:** Concentração de óxido nítrico no pênis de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kgD (doses descontinuas de BGE 3-3d).



**Figura 8:** Contribuição relativa das características quantitativas/ qualitativas de maior importância para a divergência entre os grupos de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE). 1 - Controle (Água); 2 – Citrato de Sildenafil; 3- BGE 100; 4- BGE 200; 5 – BGE 400mg/kg (Doses diárias de BGE), 6 - BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d).



**Figura 9:** Contribuição relativa das características quantitativas/ qualitativas de maior importância para a divergência entre os grupos de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Extrato do ginseng brasileiro BGE).



## 5. CONCLUSÕES GERAIS

O extrato do ginseng brasileiro causou aumento de espécies reativas de oxigênio que provocaram dano ao DNA dos espermatozoides e conseqüentemente a perda embrionária. Promoveu também aumento do óxido nítrico sistêmico que induziu morte de células germinativas nas doses de 200mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kg D além das células intersticiais nas doses de 400mg/kg e 200mg/kg D, levando à redução dos níveis sistêmicos de testosterona e aumento dos níveis de estradiol. A ingestão do extrato do ginseng brasileiro causou ainda aumento dos corpos cavernosos nas doses 200mg/kg, 400mg/kg e 200mg/kg D, porém a queda da concentração de testosterona levou à diminuição do músculo liso e aumento de colágeno. No entanto a libido e a atividade sexual foram mantidas, apesar da redução do músculo liso.

Sendo assim o extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata* atua sim como um afrodisíaco, tendo a dose menor uma resposta semelhante ao Citrato de sildenafil. Com o aumento da dose os efeitos sobre a libido são potencializada, porém causam efeitos colaterais nas células germinativas, Leydig, testosterona, estradiol. O uso descontinuo potencializa todos os efeitos causados.

