

**FABIANA CRISTINA SILVEIRA ALVES DE MELO**

**EFEITO DA INFUSÃO DO CAULE DE CIPÓ-CRAVO (*Tynnanthus fasciculatus*  
MIERS, BIGNONIACEAE) SOBRE AS CARACTERÍSTICAS  
MORFOMÉTRICAS DE COMPONENTES TESTICULARES DE RATOS  
WISTAR 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  
2007

**FABIANA CRISTINA SILVEIRA ALVES DE MELO**

**EFEITO DA INFUSÃO DO CAULE DE CIPÓ-CRAVO (*Tynnanthus fasciculatus*  
MIERS, BIGNONIACEAE) SOBRE AS CARACTERÍSTICAS  
MORFOMÉTRICAS DE COMPONENTES TESTICULARES DE RATOS  
WISTAR 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: 20 de dezembro de 2007.

---

Prof. Tarcízio Antônio R. de Paula  
(Co-Orientador)

---

Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Co-Orientador)

---

Prof. João Paulo Viana Leite

---

Prof. Marcelo Barreto da Silva

---

Prof. Sérgio Luis P. da Matta  
(Orientador)

Aos meus amados pais e irmãos.

Ao meu sempre companheiro, amigo e marido Fabiano

Aos meus tesouros preciosos Amanda e Isabela

Ao meu orientador e amigo Sérgio Luis Pinto da Matta

*“Um excelente educador não é um ser humano perfeito, mas alguém que tem serenidade  
para se esvaziar e sensibilidade para aprender”*

(Augusto Cury)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, responsável por todas as bênçãos e conquistas em minha vida, inclusive esta.

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

Aos meus irmãos Alessandra e Celsinho, pelo apoio, amizade e principalmente pelo amor que nos une.

Ao meu marido Fabiano, pelo constante apoio, amizade e amor dedicado durante todos estes anos. Não conseguiria mais esta vitória sem a sua ajuda e compreensão. Te amo!

Às minhas filhas Amanda e Isabela, que me proporcionaram o prazer de ser mãe, palavra única e indescritível, e que souberam entender meus momentos de ausência por acreditarem que cada meta que temos na vida é para o bem de toda a nossa família. Obrigada meus anjinhos!

Ao meu cunhado Eber e meu querido sobrinho Gabriel por proporcionar momentos de alegria e felicidade em família durante os encontros em Viçosa.

À Regina, que com todo o seu amor e bondade cuidou da minha casa e das minhas filhas nos meus momentos de ausência.

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa fornecida durante o período do doutorado por intermédio da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG).

À Fafile Carangola/UEMG pelos ensinamentos profissionais e pessoais, que muito contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao meu orientador e amigo Sérgio Luis Pinto da Matta, por sempre acreditar em mim e fazer de mim uma pessoa e profissional mais capacitada. Espelho-me muito em você e serei eternamente grata pelos seus ensinamentos e conhecimentos. Que Deus continue te iluminando e fazendo de você essa pessoa abençoada como sabemos que é.

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

Aos professores e co-orientadores Tarcízio Antônio Rêgo de Paula e Clóvis Andrade Neves pela amizade e contribuições ao longo deste trabalho.

Aos professores da banca João Paulo Viana Leite e Marcelo Barreto da Silva, por todas as considerações que certamente contribuirão para a melhoria deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural Adilson, Isabel e José Lino pela colaboração, convivência e aprendizagem durante estes anos.

Aos funcionários do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFV, Adão Custódio de Carvalho e Juliano Souza Cardoso, por disponibilizarem tempo e cuidados imprescindíveis para a execução do experimento.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal por ceder espaço e equipamento para a captura das imagens.

Aos meus amigos de espermatogênese e de coração, pelo apoio incondicional durante o curso e principalmente durante o experimento, Luiz Carlos Chierogatto, João Bosco Gonçalves de Barros e Marcos de Lucca Moreira Gomes. Isto é só uma demonstração das parcerias de trabalho e da verdadeira amizade que construímos.

Às amigas que auxiliaram no tratamento dos animais, Luana e Jesy, obrigada!

A todos os amigos do laboratório Ana Paula, Juliana, Dani, Marli, Diego, Katiane, Fabíola, Vinícius, Alex, Lílian, Sirlene, Patrícia, Mônica, Fabiano, Gláucia, Michele, Gisele, Max, e a todas as pessoas que transitaram pelo laboratório, lugar acolhedor, obrigada pelos momentos de descontração e cooperação.

À Luciana Coutinho de Oliveira, bolsista de iniciação científica, pela imensa contribuição no processamento de todo o material. Você foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Valeu!

Às minhas amigas de Carangola Tuca, Millene, Sarinha e Áquila (Álica), vocês fizeram e fazem parte desta conquista. Obrigada por todo apoio e amizade durante estes anos e por estarem comigo em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins.

Aos meus alunos de Carangola (MG) e Jataí (GO), obrigada por toda a experiência vivida e por toda torcida para a conquista desta etapa. Dedico este trabalho a vocês porque são responsáveis por essa busca em aprimorar a cada dia meus conhecimentos.

## **BIOGRAFIA**

Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, filha de Celso Lúcio Alves e Márcia Maria Silveira Alves, nasceu em João Monlevade, Minas Gerais, em 08 de março de 1976.

Em março de 1999 graduou-se como Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal em Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. Durante sua graduação, de 1994 a 1999, foi estagiária do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, desenvolvendo trabalhos na área de morfologia reprodutiva.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, defendendo a dissertação em 29 de junho de 2001 com o título “Efeitos de diferentes crioprotetores na criopreservação do sêmen de matrinchã *Brycon lundii* (Characiformes: Characidae)”.

Em março de 2005, ingressou no programa de doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, defendendo a tese em 20 de dezembro de 2007.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1 - FITOTERAPIA .....	1
2 - TERAPIA DA ESTIMULAÇÃO SEXUAL – AFRODISÍACOS .....	4
3 - O CIPÓ-CRAVO .....	5
4 - TESTÍCULO.....	7
5 - ESPERMATOGÊNESE .....	9
6 - CÉLULAS DE SERTOLI .....	11
7 - CÉLULAS DE LEYDIG .....	12
8 - REFERÊNCIAS .....	15
<b>1. EFEITO DA INFUSÃO DO CAULE DE CIPÓ-CRAVO <i>TYNNANTHUS FASCICULATUS</i> (BIGNONIACEAE) EM CARACTERÍSTICAS TESTICULARES DE RATOS WISTAR ADULTOS.....</b>	<b>25</b>
RESUMO .....	25
1 - INTRODUÇÃO .....	26
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	27
2.1 - Coleta e processamento do material botânico.....	27
2.2 - Animais e grupos experimentais .....	28
2.3 - Análises morfológicas e morfométricas .....	29
3 - RESULTADOS .....	31
4 - DISCUSSÃO .....	32
5 - REFERÊNCIAS .....	35
<b>2. MORFOMETRIA DO COMPARTIMENTO TUBULAR DE TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM INFUSÃO DO CAULE DE CIPÓ-CRAVO, <i>TYNNANTHUS</i> <i>FASCICULATUS</i> (BIGNONIACEAE).....</b>	<b>41</b>
RESUMO .....	41
1 - INTRODUÇÃO .....	42
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 - Coleta e processamento do material botânico.....	43
2.2 - Animais e grupos experimentais .....	44
2.3 - Análises morfológicas e morfométricas .....	45
2.4 - Contagem da população celular dos túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.....	45
2.5 - Razões entre os números celulares .....	47
2.6 - Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo.....	48
2.7 - Cálculo da produção espermática diária total e por grama de testículo .....	48
2.8 - Análises estatísticas .....	49
3 - RESULTADOS .....	49
4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	50
5 - REFERÊNCIAS .....	54
<b>3. MORFOMETRIA DO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DE RATOS WISTAR TRATADOS COM INFUSÃO DO CAULE DE CIPÓ-CRAVO <i>TYNNANTHUS FASCICULATUS</i> (BIGNONIACEAE).....</b>	<b>62</b>
RESUMO .....	62
1 - INTRODUÇÃO .....	63

2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1 - Coleta e processamento do material botânico.....	65
2.2 - Animais e grupos experimentais.....	65
2.3 - Análises morfológicas e morfométricas.....	66
2.4 - Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo.....	67
2.5 - Morfometria da célula de Leydig.....	67
2.6 - Análises estatísticas.....	69
3 - RESULTADOS.....	69
4 - DISCUSSÃO.....	70
5 - REFERÊNCIAS.....	75
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>85</b>

## RESUMO

MELO, Fabiana Cristina Silveira Alves de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007. **Efeito da infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers, Bignoniaceae) sobre as características morfométricas de componentes testiculares de ratos Wistar adultos.** Orientador: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Orientadores: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula e Clóvis Andrade Neves.

Nos últimos anos tem aumentado a procura de substâncias de origem vegetal na busca constante da resolução das disfunções sexuais, especialmente masculinas. O cipó-cravo, *Tynnanthus fasciculatus*, é uma planta utilizada como medicamento caseiro para combater má digestão e dores no estômago, e também adotada popularmente como estimulante geral e afrodisíaco. Foram avaliados os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo na biometria corporal e nos compartimentos tubular e intertubular do testículo de ratos Wistar adultos. Utilizaram-se 30 ratos machos em idade reprodutiva, divididos em 3 grupos, sendo um grupo controle, que recebeu água destilada e dois que receberam infusão do caule de cipó-cravo nas doses de 100 e 200mg/animal/dia, respectivamente. A dose de 200mg promoveu aumento significativo no peso testicular, no peso do parênquima testicular, no volume dos túbulos seminíferos, no comprimento total dos túbulos seminíferos, na produção espermática diária total e na produção espermática por grama de testículo. O tratamento com *T. fasciculatus* reduziu a proporção volumétrica e volume de tecido conjuntivo e proporcionou aumento de macrófagos do intertúbulo. A dose de 100mg promoveu aumento do volume das células de Leydig, o que pode ser justificado pelo aumento do número de células de Leydig e confirmado pelo maior valor do índice Leydigossomático. Estes resultados podem estar associados a interações celulares, onde fatores parácrinos produzidos principalmente pelas células de Leydig e macrófagos podem estar atuando no processo esteroideogênico. Os dados apresentados permitem sugerir que o tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus*, na dose de 200mg, promoveu maior produção espermatogênica, não sendo observadas estruturas

que demonstrassem alterações no parênquima testicular ou mesmo o comprometimento da espermatogênese.

## ABSTRACT

MELO, Fabiana Cristina Silveira Alves de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, December, 2007. **Infusion effect of the stem herb (*Tynnanthus fasciculatus* Miers, Bignoniaceae) on the morphometric characteristics of testis components of adult rats Wistar.** Adviser: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Advisers: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula and Clóvis Andrade Neves.

In the last years it has been increasing the search for substances of vegetable origin in the constant search of the resolution of the sexual dysfunctions, mainly of males. The *Tynnanthus fasciculatus* is a plant used like medicines to fight bad digestion and pains in the stomach, and also adopted popularly like general and aphrodisiac stimulant. It was evaluated the effects of the infusion of the stem herb *T. fasciculatus* at the corporal biometric and at the tubules and intertubules compartments in the testes of adult Wistar rats. Thirty male rats were used in reproductive age, separated in 3 groups, one control group, what received distilled water and two groups receiving infusion of the stem herb *T. fasciculatus* (dose 100 and 200mg/animal/day). The higher dose (200mg) promoted a significant increase in testes and in testicular parenchyma weights, in the volume and total length of the seminiferous tubules, in the daily spermatogenic production rate total and per gram of testis. The treatment with *T. fasciculatus* reduced the volumetric proportion and volume of conjunctive tissue and provided increase of macrophage of the intertubules. The dose 100mg/animal/day promoted increase of the volume of the Leydig cells, which can be justified by the increase of the number of Leydig cells and confirmed by the higher value of the Leydigosomatic index. These results can be associated to cellular interactions, where paracrine factors produced mainly by the Leydig cells and macrophages can be acting in the steroidogenic process. The present data suggest that the treatment with infusion of the stem herb *T. fasciculatus*, in the dose 200mg, promoted higher spermatogenic production, when there were any observed

structures that demonstrating alterations in the testicular parenchyma or even the compromising of the spermatogenesis.

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1 - Fitoterapia

Desde os primórdios de nossa história, o homem busca na natureza a cura para suas enfermidades. A utilização de plantas medicinais faz parte da rotina da maioria dos povos, desde aqueles que ainda mantêm costumes primitivos, até o homem atual, que tem acesso aos grandes avanços tecnológicos da nossa era.

Atualmente, no início do século XXI, a consagração da busca de princípios ativos e de extratos padronizados oriundos de plantas é um fato inegável. A importância da pesquisa na área de produtos naturais tornou-se um fato de peso em todos os países desenvolvidos, principalmente devido à possibilidade de descoberta de vários princípios ativos que poderão ser utilizados tanto para fins medicamentosos quanto estéticos (Jamal, 2002).

No Brasil, o uso de plantas medicinais pela população é bastante difundido e suas potencialidades nesse setor são reconhecidas mundialmente. Estima-se que pelo menos metade das espécies nativas possui alguma propriedade medicinal, mas nem 1% foi estudada adequadamente. O uso de plantas na terapêutica é impulsionado pela promessa da produção de medicamentos com preços mais acessíveis e pela grande aceitação dos produtos naturais pela população. Dessa forma, estudos criteriosos sobre as espécies vegetais são necessários e imprescindíveis para que haja comprovação ou não de seus efeitos terapêuticos ou farmacológicos e dos possíveis efeitos colaterais e/ou tóxicos.

O primeiro passo a ser dado em experimentos com plantas com provável ação terapêutica é uma pesquisa etnobotânica, onde deverão ser feitas coletas das plantas e a obtenção de informações sobre o uso dessas espécies. A etnofarmacologia é definida como a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (Sandes & Di Blasi, 2002). Essas informações seriam disponibilizadas por integrantes de um grupo humano e, de acordo com Di Stasi (1996), “qualquer membro de uma sociedade, que possua competência cultural, pode se constituir em informante válido”. Dificilmente uma planta é escolhida por acaso para desenvolver uma pesquisa. Geralmente, os pesquisadores procuram extratos de uso popular e que têm repetidos relatos de serem bem sucedidos em combater enfermidades para iniciar suas pesquisas científicas (Sandes & Di Blasi, 2002).

Após a coleta, as plantas são submetidas à classificação e identificação botânica e verificação de determinados caracteres, como aspectos morfológicos, estruturais e taxonômicos. Esta metodologia sistematizada, como mencionada por Miguel & Miguel (2000), irá nortear a direção da pesquisa agrônômica, farmacológica e química, promovendo a garantia de preservação e melhoramento das espécies.

Estudos agrônômicos também devem estar presentes em tais experimentos. Assim, é importante que sejam estudados em relação às plantas de interesse medicinal os aspectos fenológicos, forma de propagação, época de plantio, época de coleta, necessidades nutricionais, ocorrência de pragas e doenças, densidade de plantas, secagem, beneficiamento e armazenamento (Miguel & Miguel, 2000). Furlan (1998) menciona que os aspectos agrônômicos das plantas medicinais ainda são pouco pesquisados em função do escasso número de pesquisadores. Conseqüentemente, inúmeras plantas de interesse mundial não têm sequer recebido atenção sobre assuntos

básicos e desta forma, o produtor acaba descobrindo informações empiricamente e o produto colhido fica com qualidade inferior quando comparado a culturas tradicionais.

Para o controle de qualidade das drogas vegetais, com a finalidade de produção do medicamento, introduz-se a Farmacognosia, que irá elucidar a composição química, a pureza, a análise quantitativa de substâncias ativas e atividade da droga. Furlan (1998) afirma que, conhecer o que é produzido pelas plantas e o que as tornam possuidoras de efeito medicinal é imprescindível. Conciliada à Farmacognosia temos a Fitoquímica, que tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença.

De acordo com Miguel & Miguel (2000), ao entender o fitoterápico como medicamento, temos que submetê-lo às etapas normais de validação. Diante dessa afirmação, a resolução RDC 48, de 16 de março de 2004, que trata do registro de fitoterápicos, exige a apresentação de estudos científicos, farmacológicos pré-clínicos e clínicos bem como toxicológicos pré-clínicos e clínicos, para o registro e comercialização destes medicamentos.

A partir desta seqüência de estudos, poderemos garantir que cheguem às nossas farmácias, medicamentos fitoterápicos com composição e dosificação determinadas, em embalagens higiênicas, com validade determinada, garantindo eficácia terapêutica comprovada e nos padrões exigidos pelos órgãos reguladores do setor (Miguel & Miguel, 2000).

Nos últimos vinte anos no Brasil, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (Brito & Brito, 1996). Isto mostra que em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais deveriam ser incentivadas. Afinal, elas poderiam levar à reorganização das estruturas de uso dos recursos naturais (necessidade de sua extração

estar associada a planos de manejo) e à elevação do PIB, visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos (Guarim Neto & Moraes, 2003).

## **2 - Terapia da Estimulação Sexual – Afrodisíacos**

Dentre os diversos usos conhecidos das plantas medicinais, os estimulantes ou afrodisíacos ocupam lugar de destaque na medicina popular, sendo objeto de grande interesse da comunidade científica que se ocupa, ainda que timidamente, da desmistificação ou validação da sua aplicabilidade (Chieregatto, 2005). No Brasil, apesar da grande quantidade de plantas utilizadas como afrodisíacas na medicina popular, pouco se sabe sobre suas reais potencialidades e, principalmente, sobre sua ação no aparelho reprodutor.

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.

A busca de novos afrodisíacos, assim como o conhecimento do modo de ação daqueles já largamente utilizados na medicina tradicional de vários países, é uma preocupação global e tem levado cientistas de vários países, desenvolvidos ou não, a pesquisarem sobre o assunto. Esta afirmativa pode ser corroborada pela busca constante da resolução das disfunções sexuais, especialmente masculinas, o que tem levado à pesquisa e descoberta de drogas para essa finalidade e que são colocadas no mercado a preços exorbitantes, inacessíveis para grande parte da população com problemas dessa natureza.

O uso indiscriminado de fitoterápicos com finalidades afrodisíacas é extremamente temerário, visto a falta de informações conclusivas de seus mecanismos de ação e, principalmente, seus efeitos sobre o processo espermatozoidal. Segundo Aitken (1999), existe não somente uma forte indicação do declínio da contagem de

espermatozoides, mas também grande evidência da diminuição da competência funcional da produção espermática humana, provavelmente ligada às mudanças comportamentais, de vestuário e de substâncias ingeridas. Portanto, a ação direta sobre o processo espermatogênico, de diversas substâncias utilizadas atualmente, deveria ser avaliada antes da liberação ao consumo indiscriminado.

Apesar da ânsia de se encontrar produtos que possuam propriedades estimulantes afrodisíacas, não se deve descuidar dos efeitos indesejáveis da utilização de fármacos naturais que, embora sejam quase sempre eficazes na estimulação sexual, possuem princípios ativos muitas vezes tóxicos para os usuários, não somente pela qualidade como também pela quantidade da substância ingerida. Assim, estudos da toxicidade são necessários quando se monitora a ação de um fármaco natural ou de drogas afrodisíacas, pois, a substância pode acarretar, dentre vários problemas, alterações sangüíneas, dependência, intoxicação, envenenamento e até a morte do usuário como pode ser observado amplamente na literatura (Fisch et al., 1978; Salazar-Schettino, 1983; Linden et al., 1985; Bogart et al., 1986; Forsyth & Moulden, 1991; Polettini et al., 1992; Marcovigi et al., 1995; Karras et al., 1996; Siddiqui et al., 1996; Stambach et al., 1997; Lee et al., 1999; Ruck et al., 1999; El-Thaer et al., 2001).

### **3 - O Cipó-Cravo**

Os cipós são plantas que começam a vida como plântulas terrestres, mas que dependem de suporte externo para alcançar uma altura apreciável. Algumas espécies de cipó são coletadas e vendidas para a indústria de móveis, enquanto outras são coletadas para uso medicinal (Coelho & Silva, 2003).

Bastante utilizada na medicina popular, a espécie *Tynnanthus fasciculatus* Miers (Figura 1) pertencente à família Bignoniaceae, conhecida como cipó-cravo ou cipó-

trindade, originária da Mata Atlântica. É adotada popularmente como estimulante e afrodisíaco e também utilizada há séculos como medicamento caseiro para combater má digestão e dores no estômago (Amorim et al., 1994). É um cipó nativo da região Sudeste do Brasil, cujas folhas e caule possuem aroma semelhante ao cravo da Índia, fato que deu origem ao nome cipó-cravo. Pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) comprovaram em testes com camundongos o efeito analgésico desse vegetal, não apresentando toxicidade durante sua administração (Agência Fapesp, 2003). Segundo os pesquisadores, estudos fitoquímicos prévios já haviam apontado nessa planta a presença do alcalóide tinantina, substância esta que poderia ser responsável por sua propriedade analgésica.

Caules de *T. fasciculatus* são preconizados na medicina popular para preparações afrodisíacas, indicadas contra impotência sexual (Coelho & Silva, 2003). O amplo emprego desta planta nas práticas caseiras da medicina popular e no hábito do povo são motivos suficientes para sua escolha como temas de estudos químicos, farmacológicos e clínicos, visando uma investigação mais detalhada das indicações citadas bem como de seus efeitos deletérios.



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

#### 4 - Testículo

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

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o intertubular ou intersticial e o tubular (Russell et al., 1990). Os componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, mastócitos e macrófagos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França & Russell, 1998; Godinho, 1999), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente neste compartimento.

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, que se encontra localizada numa região bastante rica em vasos e tecido conjuntivo denominada

mediastino testicular. A partir desta região, a rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes.

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mióides ou peritubulares e matriz extracelular. Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o basal e o adluminal. A divisão e proliferação das espermatogônias até espermatócito primário em pré-leptóteno ocorrem no ambiente basal, ou seja, abaixo das junções entre as células de Sertoli adjacentes. No início da fase de leptóteno da primeira divisão meiótica, os espermatócitos primários migram através da barreira hemato-testicular para o ambiente adluminal, onde a meiose continua e a espermiogênese ocorre (Dym, 1973; Russell, 1977; Russell & Peterson, 1985). Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e imunoprivilegiado, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994). No lume tubular se encontram o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém espermiados.

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998). O comprimento total de túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: tamanho do testículo, diâmetro tubular e densidade volumétrica dos túbulos seminíferos. O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos

seminíferos por testículo perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (Bascom & Ostrud, 1925). Já no suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (França & Russell, 1998). De maneira geral, há de 10 a 15 metros de túbulo por grama de testículo em grande parte dos mamíferos já estudados (França & Russell, 1998).

A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (Attal & Courot, 1963; Godinho & Cardoso, 1979; Sinha Hikim et al., 1991; Russell et al., 1994; Muñoz et al., 1998).

## **5 - Espermatogênese**

A espermatogênese é um processo altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França & Russell, 1998; França et al., 1998; Godinho, 1999). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, caracterizada por várias e sucessivas divisões mitóticas dos diferentes tipos de espermatogônias; (b) fase meiótica ou espermatocitogênica, após a duplicação do DNA no pré-leptóteno, síntese de RNA no espermatócito em paquíteno e finalização da meiose, durante a qual ocorre uma divisão reducional acompanhada de recombinação gênica e uma divisão equacional na qual, teoricamente, cada espermatócito em paquíteno dará origem a quatro espermátides haplóides; (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por profundas alterações estruturais e bioquímicas e diferencia-se em

espermatozóide, um tipo celular morfológicamente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (Sharpe, 1994).

A espermatogênese inicia-se com a célula germinativa primitiva, a espermatogônia A, que é a célula fonte localizada junto à membrana basal. As espermatogônias se dividem por mitose e as células neoformadas podem continuar a dividir e originar novas espermatogônias ou parar a divisão e crescer, originando os espermatócitos de primeira ordem ou espermatócitos I, células que entram em meiose. Como a prófase da primeira divisão meiótica é muito demorada, a maioria dos espermatócitos I vistos nas preparações histológicas está nessa fase. Os espermatócitos I são as maiores células da linhagem espermatogênica e são caracterizados pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Dessa primeira divisão meiótica resultam células menores, os espermatócitos de segunda ordem ou espermatócitos II. Os espermatócitos II ficam mais próximos da luz dos túbulos seminíferos e é difícil observá-los em cortes histológicos, pois entram logo na segunda divisão meiótica. Desta divisão resultam as espermatídes, células que são caracterizadas pelo pequeno tamanho, núcleos com zona de cromatina condensada e por sua localização quase na luz dos túbulos seminíferos. Nesta fase terminam as divisões celulares da espermatogênese e cada espermatíde passará por um processo de modificações complexas denominado espermiogênese, que levará à formação dos espermatozóides. Podem ser observadas nas preparações histológicas espermatídes com a mais variada morfologia, de acordo com a fase da espermiogênese em que se encontram (Junqueira & Carneiro, 2004; Kierszenbaum, 2004).

Nos túbulos seminíferos, as células germinativas não estão organizadas ao acaso e sim em associações celulares distintas denominadas de estádios, os quais se sucedem com o tempo de maneira bastante ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero. Os

estádios do ciclo podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; França & Russell, 1998) e pelo método do sistema acrossômico (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990). No primeiro caso 8 estádios do ciclo são obtidos para todas as espécies, enquanto que pelo sistema acrossômico o número de estádios classificados é variado para cada espécie. A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie-específica, que está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). De maneira geral, em torno de 4,5 ciclos são necessários para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, desde uma espermatogônia do tipo A<sub>1</sub> até a liberação dos espermatozóides no lume do túbulo seminífero (Amann & Schanbacher, 1983; França & Russell, 1998).

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre esses dois tipos celulares, incluindo-se desmossomos, junções do tipo “gap” e as junções à base de actina. Apesar de serem postuladas várias funções para estes componentes juncionais, existem ainda poucas evidências experimentais para apoiar o papel preciso dos mesmos (Russell & Griswold, 1993). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1991; Daduone & Demuolin, 1993; Jégou, 1993; Spiteri-Grech & Nieschlag, 1993; Pescovitz et al., 1994; Russell et al., 1994; Griswold, 1995; Schlatt et al., 1997; França & Russell, 1998). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e células mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

## **6 - Células de Sertoli**

Nos testículos de animais sexualmente maduros, as células de Sertoli estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o qual reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (Russell, 1993). Além da formação da barreira de células de Sertoli já citada anteriormente, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, podem-se destacar: o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas; mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese; fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas; participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides para o lume tubular; fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose. As células de Sertoli secretam fluido em direção ao lume tubular, o qual possui substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides. A secreção de fluido também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando a mesma envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como células mióides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (Russell & Griswold, 1993; Bardin et al., 1993; Poccia, 1994; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998).

## **7 - Células de Leydig**

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (Bardin, 1996). Esta produção de andrógenos ocorre por meio de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana plasmática das células de Leydig.

Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, células mióides, células musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (Schlatt et al., 1997; Suárez-Quian et al., 1998). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996) e pelo aparecimento e manutenção dos caracteres sexuais secundários e a sustentação quali-quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994). Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Luke & Coffey, 1994; Fan & Robaire, 1998; Goyal et al., 1999).

Nos mamíferos, existem dois tipos de células de Leydig: as células de Leydig fetais, que são produtoras de testosterona responsável pela masculinização fetal e as células de Leydig do tipo adulto produtoras de testosterona responsável pelas características sexuais secundárias e pelo processo espermatogênico (Kerr & Knell, 1988; Kuopio et al., 1989; Huhtaniemi et al., 1992). O início da diferenciação das células de Leydig fetais e da produção de andrógenos não está sob o controle das gonadotrofinas (Van Vorstenbosch et al., 1982; Lejeune et al., 1998; Majdic et al., 1998; O'Shaughnessy et al., 1998). O desenvolvimento pós-natal das células de Leydig envolve a proliferação celular, diferenciação morfológica e aquisição da capacidade de produção de testosterona. De acordo com Ge et al. (1996) e Rouiller-Fabre et al. (1998),

a transição das células de Leydig em proliferação, originadas de células progenitoras, para as células de Leydig do tipo adulto é regulada hormonalmente. O LH induz primariamente a diferenciação das células de Leydig, não estando envolvido com a estimulação da proliferação das mesmas. Os andrógenos e o IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina) aumentam a sensibilidade das células de Leydig progenitoras ao LH. A proliferação é estimulada por IGF-I e fatores secretados pelas células de Sertoli e por macrófagos, enquanto o estradiol provavelmente limita o crescimento da população de células de Leydig por meio da inibição de proliferação das progenitoras de células de Leydig (Ge et al., 1996).

No presente trabalho objetivou-se analisar os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo (*T. fasciculatus*) sobre testículos de ratos Wistar adultos, avaliando quantitativamente, através de análises histométricas, possíveis alterações nas estruturas testiculares quanto a (ao):

- Proporção volumétrica e volume de túbulos seminíferos e intertúbulo;
- Índices gonadossomático, tubulossomático e Leydigossomático;
- Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos;
- Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo;
- Diâmetro nuclear e relação núcleo-plasmática das células de Leydig;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Número total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Número corrigido de células espermatogênicas por secção de túbulo seminífero no estágio I do ciclo do epitélio seminífero;
- Número total de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo;

- Razões entre os números celulares para avaliação do processo espermatogênico e das células de Sertoli – índice mitótico; índice meiótico; rendimento geral da espermatogênese; índice de eficiência da célula de Sertoli e capacidade total de suporte da célula de Sertoli e;
- Produção espermática diária total e produção espermática diária por grama de testículo.

## **8 - Referências**

AGÊNCIA FAPESP, Boletim de Notícias de 23/12/2003.

AITKEN, R.J. The human spermatozoon – a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 115, p. 1-7, 1999.

AMANN, R.P., SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, v. 57(2), p. 380-403, 1983.

AMORIM, A., ARMADA, J.L., BORBA, H.R., SALLES, J.F. Testes de mutagenicidade em camundongos tratados com extratos aquosos de *Tynnanthus fasciculatus* Miers (cipó-cravo). *Revista Brasileira de Farmácia*, v75(2), p. 46-47, 1994.

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

BARDIN, C.W. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.). The Leydig cell. Ed. Vienna, Cache River Press, 1996. Cap. 2, p. 31-42.

BARDIN, C.W., GUNSALUS, G.L., CHENG, C.Y. The cell biology of the Sertoli cell. In: Desjardins, C., Ewing, L.L. Cell and molecular biology of the testis. New York, Oxford University Press, 1993. Cap.9, p. 189-219.

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

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. Journal of Animal Science, v.44, p. 818-833, 1977.

BOGART, L., BONSIGNORE, J., CARVALHO, A. Massive hemolysis following inhalation of volatile nitrites. American Journal Hematology, v. 22(3), p. 327-329, 1986.

BRITO, A.R.M.S., BRITO, A.A.S. Medicinal plants research in Brazil: data from regional and national meetings. In: Balick, M.J., Elisabetsky, E., Laird, S.A. (Eds.). Medicinal resources of the tropical forest – biodiversity and its importance to human health. Columbia, University Press, New York, 1996, p. 386-401.

CHIEREGATTO, L.C. Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. e *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – UFV, 2005. 67p.

COELHO, M.F.B., SILVA, A.C. Plantas de uso medicinal nos municípios de Pontes e Lacerda e de Comodoro, Mato Grosso, Brasil. Revista Agricultura Tropical, v. 7(1), p. 53-61, 2003.

DADUONE, J.P., DEMUOLIN, A. Structure and functions of the testis. In: Thibault, C., Levasseur, M., Hunter, R.H.F. (Org.). Reproduction in mammals and man. Paris, Ellipses, 1993. Cap.13, p. 227-250.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. UNESP, São Paulo, 1996. 230 p.

DYM, M. The fine structure of monkey (macaca) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. The Anatomical Record, v. 175(4), p. 639-656, 1973.

DYM, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. Endocrine Reviews, v.15, p. 102-115, 1994.

EL-THAER, T.S., MATAKKA, K.Z., TAHA, H.A., BADWAN, A.A. *Ferula harmonis* ‘zallouh’ and enhancing erectile function in rats efficacy and toxicity study. International Journal of Impotence Research, v. 13(4), p. 246-251, 2001.

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

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

FISCH, H.P., REUTTER, F.W., GLOOR, F. Lesions of the kidney and the efferent urinary tract due to cantharidine. Schweizerische Medizinische Wochenschrift, v. 108(43), p. 1664-1667, 1978.

FORSYTH, R.J., MOULDEN, A. Methaemoglobinemia after ingestion of amyl nitrite. Archives Disease in Childhood, v. 66(1), p. 152, 1991.

FRANÇA, L.R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F. and Regadera, J. (Org.). Male reproduction - a multidisciplinary overview. Madrid, Churchill Communications, 1998. Cap 16, p.198-219.

FRANÇA, L.R., PARREIRA, G.G., GATES, R.J., RUSSELL, L.D. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. *Journal of Andrology*, v.19, p.335-342, 1998.

FURLAN, M.R. Cultivo de Plantas Mediciniais. Cuiabá, SEBRAE, 1998. 137p.

GE, R.S., SHAN, L.X., HARDY, M.P. Pubertal development of Leydig cells. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D.(Eds.). *The Leydig cell*. Ed. Vienna, Cache River Press, 1996. Cap. 6, p. 159-174

GODINHO, C.L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Tese (Mestrado em Biologia Celular) – UFMG, 1999. 74p.

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

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

GRISWOLD, M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction*, v. 52, p. 211-216, 1995.

GUARIM NETO, G., MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica*, v. 17(4), p. 561-584, 2003.

HUHTANIEMI, I., PELLINIEMI, L.J. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 201, p.125-140, 1992.

JAMAL, C.M. Estudo fitoquímico de *Casearia sylvestris* Sw. e de *Abatia tomentosa* Mart. (Flacourtiaceae). Análise de derivados fenólicos, por CLAE. Tese de Doutorado – UFMG, 2002.

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

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10<sup>a</sup> Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004. 488p.

KARRAS, D.J., FARRELL, S.E., HARRIGAN, R.A., HENRETIG, F.M., GEALT, L. Poisoning from “Spanish fly” (cantharidin). *American Journal of Emergency Medicine*, v. 14(5), p. 478-483, 1996.

KERR, J.B., KNELL, C.M. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal. *Development*, v.103, p. 535-544, 1988.

KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução à Patologia*. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2004. 654p.

KUOPIO, T., TAPANAINEN, J., PELLINIEMI, L.J., HUHTANIEMI, I. Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development*, v.107, p.213-220, 1989.

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

LEE, S.W., LEE, J.Y., LEE, K.J., KIM, M., KIM, M.J. A case of methemoglobinemia after ingestion of an aphrodisiac, later proven as dapson. *Journal Yonsei of Medicine*, v. 40(4), p. 388-391, 1999.

LEJEUNE, H., HABERT, R., SAEZ, J.M. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.20, p.1-25, 1998.

LINDEN, C.H., VELLMAN, W.P., RUMACK, B. Yohimbine: a new street drug. *Annales of Emergency Medicine*, v. 14(10), p. 1002-1004, 1985.

LUKE, M.C., COFFEY, D.S. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press, 1994. v.1, Cap. 23, p. 1435-1488.

MAJDIC, G., SAUNDERS, P.T.K., TEERDS, K.J. Immunoeexpression of the steroidogenic enzymes 3-Beta Hydroxysteroid dehydrogenase and 17 $\alpha$ -hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biology of Reproduction*, v.58, p.520-525, 1998.

MARCOVIGI, P., LEONI, S., CALBI, G., VALTANCOLI, E., RAVAGLIA, G. Acute poisoning caused by cantharidin ingestion for aphrodisiac purposes. A clinical case. *Minerva Anesthesiology*, v. 61(3), p. 105-107, 1995.

MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de Fitoterápicos. São Paulo, Robe Editorial, 2000. 116p.

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

O'SHAUGHNESSY, P.J., BAKER, P., SOHNIUS, U., HAAVISTO, A.-M., CHARLTON, H.M., HUHTANIEMI, I. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. Endocrinology, v.139, p.1141-1146, 1998.

PELLINIEMI, L.J., KUOPIO, T., FRÖJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D.(Eds.). The Leydig cell. Ed. Vienna, Cache River Press, 1996. Cap. 5, p. 143-157.

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

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

POLETTINI, A., CRIPPA, O., RAVAGLI, A., SARAGONI, A. A fatal case of poisoning with cantharidin. Forensic Science International, v. 56(1), p. 37-43, 1992.

ROUILLER-FABRE, V., LECERF, L., GAUTIER, C., SAEZ, J.M., HABERT, R. Expression and effects of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology*, v. 139, p. 2926-2934, 1998.

RUCK, B., SHIH, R.D., MARCUS, S.M. Hypertensive crisis from herbal treatment of impotence. *American Journal of Emergency Medicine*, v. 17(3), p. 317-318, 1999.

RUSSELL, L.D. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, v. 148(3), p.313-328, 1977.

RUSSELL, L.D. Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. In: Russell, L.D., GRISWOLD, M.D. *The Sertoli cell*. Ed. Clearwater, Cache River Press, 1993. Cap.1, p. 1-38.

RUSSELL, L.D. & PETERSON, R.N. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International Review of Cytology*, v.94, p. 177-211, 1985.

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

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

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

SALAZAR-SCHETTINO, P.M. Customs which predispose to Chagas disease and cysticercosis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 32(5), p. 1179-1180, 1983.

SANDES, A.R.R., DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2002. Disponível em: [www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br). Acesso em 17 Julho. 2004.

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

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

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T. *Reproduction in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> Ed. San Diego: Academic Press, Inc., 1991. Cap. 6, p. 221-250.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*, ed.2, New York, Raven Press, 1994. v.1, Cap 22, p.1363-1434.

SIDDIQUI, M.A., MORE-O'FERRAL, D., HAMMOND, R.S., BAIME, R.V., STADDON, A.P. Agranulocytosis associated with yohimbine use. *Archives of Internal Medicine*, v. 156(11), p. 1235-1236, 1996.

SINHA-HIKIM, A.P., SINHA-HIKIM, I.S., AMADOR, A.G., BARTKE, A., WOOLF, A., RUSSELL, L.D. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a

seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. American Journal of Anatomy, v. 192(2), p. 194-213, 1991.

SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. Endocrine Reviews, v.12, p.45-77, 1991.

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

STAMBACH, T., HAIRE, K., SONI, N., BOOTH, J. Saturday night blue - a case of near fatal poisoning from the abuse of amyl nitrite. Journal of Accident and Emergency Medicine, v. 14(5), p. 339-340, 1997.

SUÁREZ-QUIAN, C.A., OKE, B.O., MUSTO, N. Localization of the androgen receptor in the rodent testis. In: Martinez-Garcia, F. and Regadera, J. (Org.). Male reproduction; a multidisciplinary overview. Madrid, Churchill Communications, 1998. Cap. 10, p. 114-124.

VAN VORSTENBOSCH, C.J.A.H.V., COLENBRANDER, B., WENSING, C.J.G. Leydig cell development of pig testis in the early fetal period: an ultrastructural study. The American Journal of Anatomy, v. 165, p. 305-318, 1982.

ZIRKIN, B.R., AWONIYI, C., GRISWOLD, M.D., RUSSELL, L.D., SHARPE, R. Is FSH required for adult spermatogenesis? Journal of Andrology, v.15, p. 273-276, 1994.

## Artigo 1

### **1. Efeito da infusão do caule de cipó-cravo *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) em características testiculares de ratos Wistar adultos**

#### **Resumo**

O uso das plantas medicinais como afrodisíacos ou estimulantes ocupa lugar de destaque na medicina popular. O cipó-cravo, *Tynnanthus fasciculatus*, é uma planta utilizada há séculos como medicamento caseiro para combater má digestão e dores no estômago, e também adotada popularmente como estimulante geral e afrodisíaco. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo na biometria corporal e em componentes testiculares de ratos Wistar adultos. Utilizaram-se 30 ratos machos em idade reprodutiva, divididos em 3 grupos, sendo um grupo controle, que recebeu água destilada e dois que receberam infusão do caule de cipó-cravo nas doses de 100 e 200mg/animal/dia, respectivamente. A dose de 200mg promoveu aumento

significativo no peso testicular, no peso do parênquima testicular, no volume dos túbulos seminíferos e no comprimento total dos túbulos seminíferos.

**Palavras-chave:** espermatogênese, *Tynnanthus fasciculatus*, plantas medicinais, testículo

## **1 - Introdução**

A utilização de plantas medicinais tem crescido consideravelmente nos últimos dez anos em países industrializados. Este aumento é devido, principalmente, à existência de doenças para as quais não existe tratamento apropriado, à crença de que a terapêutica com plantas medicinais é isenta de efeitos colaterais em comparação com as drogas convencionais, e à idéia de que tudo o que é natural é bom e pode ser superior às drogas sintéticas [1]. Entretanto, um grande número dessas plantas medicinais utilizadas não foi ainda submetido a testes científicos rigorosos e sua qualidade pode, portanto, ser questionada [2].

O potencial de toxicidade das plantas medicinais não é novidade. Em muitos países, onde plantas medicinais são comumente utilizadas, é bem conhecido que elas devem ser usadas com cuidado porque podem ser tóxicas para o fígado, rins e outros tecidos. Os efeitos tóxicos podem ser atribuídos ao uso incorreto e também a vários fatores que incluem desde a toxicidade dos constituintes da planta até a contaminação

das preparações por herbicidas, microorganismos, metais pesados ou drogas sintéticas [2].

As plantas com ação afrodisíaca ou estimulante ocupam lugar de destaque na medicina popular, sendo objeto de grande interesse da comunidade científica que se ocupa, ainda que timidamente, da desmistificação ou validação da sua aplicabilidade [3].

*Tynnanthus fasciculatus* Miers, pertencente à família Bignoniaceae, é conhecida como cipó-cravo ou cipó-trindade, sendo originária da Mata Atlântica. É uma planta nativa da Região Sudeste do Brasil, cujas folhas e caule possuem aroma semelhante ao cravo da Índia, fato que deu origem ao nome cipó-cravo. Esta planta é adotada popularmente como estimulante e afrodisíaco [4] e tem sido utilizada há séculos como medicamento caseiro para combater má-digestão e dores no estômago. Lainetti & Brito [5] citam esta planta para tratamento de gases intestinais, diarréias e combate de vermes.

Carvalho et al. [6] identificaram, através de extração em água, etanol e diclorometano, os componentes fitoquímicos do caule de cipó-cravo como açúcares redutores, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, heterosídeos cardiotônicos, saponinas, triterpenos e esteróides.

O amplo emprego de *T. fasciculatus* na medicina tradicional e o seu uso popular são motivos suficientes para sua escolha como tema de estudos químicos, farmacológicos e clínicos, visando uma investigação mais detalhada das indicações citadas bem como de seus efeitos deletérios. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo (*T. fasciculatus*) em características testiculares de ratos Wistar adultos.

## **2 - Material e métodos**

## 2.1 - Coleta e processamento do material botânico

A coleta do cipó-cravo (*T. fasciculatus*) foi realizada no mês de janeiro de 2006, no setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. O material coletado foi identificado e autenticado por comparação com espécimes do Horto Botânico da UFV, onde espécime testemunho foi depositada (exsicata n° 30.074).

Fragmentos do caule de cipó-cravo foram secos em estufa, em temperatura de 37°C, para posterior moagem e preparo das infusões. As doses utilizadas neste trabalho foram baseadas em dados etnobotânicos e, para isto, porções de 10 e 20 gramas do material triturado foram pesadas em balança de precisão (0,001g). Posteriormente, cada porção foi colocada em infusão durante 4 horas em 1 litro de água destilada em ponto de fervura. Após este período, o material foi filtrado e o restante sólido foi seco em estufa com temperatura de 37°C para cálculo da dose final presente no líquido.

## 2.2 - Animais e grupos experimentais

Os animais foram utilizados de acordo com o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório – National Research Council e em concordância com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório preconizados pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), em idade reprodutiva (120 dias), pesando em média 370 gramas e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFV. Os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais, constituindo três grupos experimentais (n=10 em cada grupo): um grupo controle que recebeu água destilada, e dois outros que receberam infusão do caule de cipó-cravo nas doses de 100 (CC100) e 200 (CC200) mg/animal/dia, respectivamente. O regime

líquido foi fornecido na quantidade de 100 ml/dia, sendo anotado diariamente o volume consumido a fim de certificar que os animais estavam ingerindo a concentração diária mínima estabelecida de 40 ml. O regime sólido (ração) foi fornecido *ad libitum*.

Os animais foram mantidos durante o período experimental (54 dias consecutivos – ação crônica sobre o testículo) em condições controladas de temperatura (média de 24,7°C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro). Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados, seus dados biométricos registrados e utilizou-se o método de perfusão corporal, modificado de Sprando [7], para fixação dos testículos. Para isto, foi feita uma abertura nas cavidades torácica e abdominal para exposição do coração e dos órgãos reprodutivos. Uma agulha foi introduzida na aorta descendente, sendo usada solução salina (0,9%) contendo heparina sódica (Liquemine®) por 10 minutos, para retirada de sangue dos vasos sanguíneos. Após o clareamento dos vasos, a solução salina foi substituída pela solução fixadora de Karnovsky (4% paraformaldeído, 4% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 molL<sup>-1</sup>, pH 7,4), perfundindo-se o animal por 15 minutos. Em seguida, foram retirados e pesados os testículos, epidídimos e glândulas vesiculares. Os órgãos coletados foram mantidos no mesmo fixador por 24 horas.

### 2.3 - Análises morfológicas e morfométricas

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em resina a base de 2-hidroxietil metacrilato, seccionados na espessura de 2 µm e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. O testículo contralateral foi dissecado e foi retirada a albugínea para calcular o percentual ocupado pela mesma no testículo.

Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

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

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

Uma vez que o testículo pode ser dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, as proporções volumétricas entre estas regiões foram estimadas a partir da contagem de 2100 pontos projetados sobre imagens capturadas utilizando objetiva de 10X, totalizando 7 campos aleatórios (grade 75x75 – 300 pontos) em diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal.

O volume de cada componente testicular, expresso em ml, foi estimado pela multiplicação do percentual ocupado por túbulos e intertúbulo pelo volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo, o peso da albugínea testicular. Como a densidade do testículo de mamíferos está em torno de 1 [8,9], o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

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

### *2.3.2 - Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos*

O diâmetro tubular médio de cada animal foi obtido a partir da medida de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível não levando em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero.

Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular, foi medida a altura do epitélio seminífero, a qual foi obtida da túnica própria até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representa a média de duas medidas diametralmente opostas.

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula [10, 11]:  $CT = VTS/\pi R^2$ , onde VTS = volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

Para o cálculo do comprimento tubular por grama de testículo, dividiu-se o valor de CT pelo peso testicular.

### *2.3.3 - Análises estatísticas*

Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan foi usada para comparar médias e desvio-padrão entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## **3 - Resultados**

Os resultados das características biométricas analisadas encontram-se na Tabela 1. O peso dos testículos (PT) e o peso do parênquima testicular (PPAR) aumentaram 8,6% e 8,7%, respectivamente, no grupo CC200 ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. As demais características avaliadas não apresentaram diferença significativa.

As proporções volumétricas (%) e o volume (ml) dos compartimentos do parênquima testicular estão demonstrados na Tabela 2. A proporção volumétrica de túbulos apresentou redução de 3,45% no grupo CC100 acompanhada pelo aumento de

18,22% de intertúbulo em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). O volume ocupado pelos túbulos seminíferos aumentou 10,3% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e não foi observada diferença significativa do volume de intertúbulo entre os grupos.

Os índices gonadossomático (IGS) e tubulossomático (ITS) encontram-se na Tabela 3. O IGS não apresentou diferença significativa entre os grupos e o ITS apresentou aumento de 10,2% no grupo CC200 em relação ao grupo CC100 ( $p < 0,05$ ), apesar dos grupos tratados não diferirem significativamente do controle.

Na Tabela 4 são apresentadas as medidas de diâmetro tubular, altura do epitélio, comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo. O diâmetro tubular não apresentou diferença significativa entre os grupos. A altura do epitélio seminífero apresentou redução de 7,34% no grupo CC200 em relação ao grupo CC100 ( $p < 0,05$ ), apesar dos grupos tratados não diferirem significativamente do controle. O comprimento total dos túbulos seminíferos aumentou 13,2% nos animais do grupo CC200 em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O comprimento dos túbulos por grama de testículo aumentou 15,19% no grupo CC200 em relação ao grupo CC100 ( $p < 0,05$ ), apesar dos grupos tratados não diferirem significativamente do controle.

#### **4 - Discussão**

O tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* em sua maior dose (CC200), aumentou significativamente o peso dos testículos e o peso do parênquima testicular. O aumento observado está relacionado a alterações nos componentes do parênquima testicular, que é a porção produtiva, gametogênica e androgênica do testículo, uma vez que o peso da albugínea não apresentou alteração significativa. Ratos

tratados com extratos de *Cynomorium coccineum* [12] e maca *Lepidium meyenii* [13] apresentaram peso médio testicular significativamente maior que os animais controle devido ao aumento no tamanho dos túbulos seminíferos e proliferação de células germinativas, caracterizando maior eficiência no processo espermatogênico. O aumento do peso testicular no grupo tratado com CC200 foi devido ao aumento significativo no volume de túbulos seminíferos em relação ao grupo controle, sugerindo aumento na produção espermática. O peso testicular ou o tamanho do testículo pode ser utilizado como indicador quantitativo da produção espermática [14], uma vez que o principal componente do testículo é o túbulo seminífero.

O índice tubulossomático (ITS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal. Os grupos tratados não diferiram significativamente em relação ao grupo controle, porém o ITS do grupo CC200 apresentou aumento significativo em relação ao grupo CC100. Isto representa maior investimento corporal na produção espermática do grupo CC200 em relação ao grupo CC100, podendo este aumento estar relacionado à dose do extrato (dose-dependente).

Apesar do aumento constatado no peso testicular dos animais do grupo CC200, o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual de massa corporal alocado em testículo, não foi alterado significativamente. Isto provavelmente está relacionado ao aumento, não significativo, no peso corporal dos animais deste grupo.

Segundo França & Russell [14], geralmente existe relação positiva entre diâmetro tubular e atividade espermatogênica do testículo. O tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* não afetou o diâmetro tubular, porém a altura do epitélio seminífero apresentou redução (7,34%) no grupo CC200 em relação ao grupo CC100, o que pode estar associado ao aumento da dose, porém ambas não diferiram

significativamente do grupo controle. A cimetidina, utilizada no tratamento de úlceras gástricas e duodenais, é citada como uma substância tóxica ao testículo, causando atrofia testicular [15]. Ratos Wistar tratados com injeções de cimetidina em diferentes concentrações não apresentaram alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos, mas apresentaram redução da altura do epitélio germinativo com o aumento da dose, sem comprometimento severo do processo espermatogênico [15].

O comprimento total dos túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: tamanho do testículo, diâmetro tubular e volume dos túbulos seminíferos. Portanto, o aumento do peso testicular e do volume total de túbulos seminíferos em animais tratados com *T. fasciculatus* na dose de 200mg, em relação ao grupo controle, refletiu em aumento no comprimento total dos túbulos, o que pode levar ao aumento da produção espermática. Como o comprimento total dos túbulos está relacionado ao peso testicular, torna-se sem sentido discutir este parâmetro entre as diversas espécies e até mesmo entre autores diferentes, uma vez que o peso do testículo é extremamente variado entre os animais. Assim, os dados são gerados para calcular o comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo, o que permite comparações mais significativas. Animais do grupo controle e tratados com infusão do caule de *T. fasciculatus* apresentaram comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo dentro da faixa conhecida para a maioria dos mamíferos investigados que é de 10 a 15 metros [14]. O grupo tratado com CC200 apresentou comprimento de túbulos por grama de testículo superior ao grupo tratado com CC100.

Os dados apresentados permitem sugerir que o tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus*, na dose de 200mg, promoveu aumento significativo no peso testicular, no volume e comprimento total de túbulos seminíferos, refletindo aumento na produção espermática. Não foram observados elementos morfológicos que

demonstrassem alterações histopatológicas no parênquima testicular ou mesmo que pudesse comprometer o processo espermatogênico.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa e à Fundação Fafile de Carangola (FAFILE/UEMG) pelo apoio e licença das atividades acadêmicas.

### **5 - Referências**

- [1] Tyler VE. Herbs of choice. The therapeutic use of phytomedicinals. New York: Pharmaceutical Products Press, 1999.
- [2] Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. Fitoterapia 2000; 71:58.
- [3] Chieregatto LC. Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. Viçosa: UFV, 2005, 67p. (dissertação, mestrado)
- [4] Rizzini CT, Mors WB. Botânica econômica brasileira. EPU/EDUSP, São Paulo. 1976.
- [5] Lainetti R, Brito NRS. A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras. Rio de Janeiro, Editora Tecnoprint Ltda. 1979.
- [6] Carvalho CA, Oliveira TG, Manfré RVR, Andrade DC, Matta SLP, Silva MB, Rosa MB. Estudo fitoquímico de *Tynnanthus fasciculatus* – Bignoniaceae. In: 47º Congresso

Brasileiro de Olericultura, Porto Seguro. Anais do Congresso Brasileiro de Olericultura, v. 25. 2007. p. 1-176.

[7] Sprando RL. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: Russell LD, Ettlín R, Sinha Hikim AP, Clegg ED, editors. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, Clearwater, 1990. p. 277-280.

[8] França LR. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. (tese, doutorado).

[9] Johnson L, Neaves WB. Biol Reprod 1981; 24:703.

[10] Attal J, Courot M. Ann Biol Anim Biochim Biophys 1963; 3:219.

[11] Dorst VJ, Sajonski H. Monatsh Vet Med 1974; 29:650.

[12] Abdel-Magied EM, Abdel-Rahman HA, Harraz FM. J Ethnopharmacol 2001; 75:01.

[13] Gonzales GF, Ruiz A, Gonzales C, Villegas L, Cordova A. J. Andrology 2001; 3:231.

[14] França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. In: Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Ed. Churchill Communications Europe España, 1998. p. 198.

[15] França LR, Leal MC, Cerri-Sasso E, Vasconcelos A, Debeljuk L, Russell LD. Biol Reprod 2000; 63:1403.

Tabela 1

Características biométricas e morfométricas de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Tratamentos	Características			
	PC (g)	PT (g)	PPAR (g)	PALB (g)
Controle	480 $\pm$ 31,62 <sup>a</sup>	3,04 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	2,89 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	0,075 $\pm$ 0,016 <sup>a</sup>
CC 100	479 $\pm$ 22,83 <sup>a</sup>	3,06 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	2,91 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,073 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
CC 200	490 $\pm$ 19,44 <sup>a</sup>	3,3 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	3,14 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	0,078 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>

PC = peso corporal; PT = peso dos testículos; PPAR = peso do parênquima testicular; PALB = peso da albugínea. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) (n=10).

Tabela 2

Proporção volumétrica e volume dos compartimentos do parênquima testicular de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Tratamentos	Proporção volumétrica (%)		Volume (ml)	
	Túbulo	Intertúbulo	Túbulo	Intertúbulo
Controle	84,08 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>	15,92 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>	2,43 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
CC 100	81,18 $\pm$ 2,97 <sup>a</sup>	18,82 $\pm$ 2,97 <sup>a</sup>	2,36 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	0,55 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
CC 200	85,27 $\pm$ 3,76 <sup>b</sup>	14,73 $\pm$ 3,76 <sup>b</sup>	2,68 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,46 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (p<0,05) (n=10).

Tabela 3

Índices Gonadossomático (IGS) e Tubulossomático (ITS) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

<b>Tratamentos</b>	<b>IGS (%)</b>	<b>ITS (%)</b>
Controle	0,64 + 0,07 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,05 <sup>a,b</sup>
CC 100	0,64 + 0,04 <sup>a</sup>	0,49 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
CC 200	0,67 + 0,05 <sup>a</sup>	0,54 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (p<0,05) (n=10).

Tabela 4

Diâmetro tubular (DT), altura do epitélio seminífero (AE), comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) e comprimento dos túbulos por grama de testículo (CT/gT) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Tratamentos	DT ( $\mu\text{m}$ )	AE ( $\mu\text{m}$ )	CT (m)	CT/gT (m/g)
Controle	301,37 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	99,03 $\pm$ 7,48 <sup>ab</sup>	34,56 $\pm$ 5,74 <sup>b</sup>	11,35 $\pm$ 1,58 <sup>a,b</sup>
CC 100	309,77 $\pm$ 16,46 <sup>a</sup>	101,57 $\pm$ 7,59 <sup>a</sup>	31,64 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	10,34 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>
CC 200	296,46 $\pm$ 20,01 <sup>a</sup>	94,11 $\pm$ 6,94 <sup>b</sup>	39,12 $\pm$ 4,47 <sup>a</sup>	11,92 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) ( $n=10$ ).

## Artigo 2

### **2. Morfometria do compartimento tubular de testículos de ratos Wistar tratados com infusão do caule de cipó-cravo, *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae)**

#### **Resumo**

A medicina tradicional oferece forte indicativo para experimentações científicas envolvendo produtos vegetais utilizados pela população. O cipó-cravo, *Tynnanthus fasciculatus*, é uma planta utilizada há séculos como medicamento caseiro para combater má digestão e dores no estômago, e também adotada popularmente como estimulante geral e afrodisíaco. Neste trabalho foram avaliados os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo no compartimento tubular de testículos de ratos Wistar adultos. Utilizaram-se 30 ratos machos, em idade reprodutiva, divididos em 3 grupos, sendo um grupo controle, que recebeu água destilada e dois que receberam infusão do caule de cipó-cravo nas doses de 100 e 200mg/animal/dia, respectivamente. A dose de 200mg promoveu aumento significativo na produção espermática diária total e na produção espermática por grama de testículo.

**Palavras-chave:** produção espermática, célula de Sertoli, células espermatogênicas, espermatogênese

## 1 - Introdução

A utilização de plantas medicinais e a fitoterapia encontram-se em expansão em todo o mundo, constituindo um mercado farmacêutico altamente promissor. Levantamentos realizados em diferentes países evidenciaram que a utilização das plantas medicinais vem se tornando cada vez mais popular no mundo industrializado (Gullo & Pereira, 2001).

Observa-se um crescente interesse por parte de pesquisadores de todo o mundo, incluindo o Brasil, em resgatar as terapêuticas naturais. Dentro desta perspectiva, esperar-se-ia que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente um terço da flora mundial (Moreira et al., 2001). Entretanto, muito pouco ainda é estudado em relação ao potencial fitoterápico nativo, correndo-se o risco de algumas espécies serem extintas devido ao extrativismo predatório.

Dentre os diversos usos conhecidos das plantas medicinais, aquelas usadas como estimulantes ou afrodisíacos ocupam lugar de destaque na medicina popular, sendo objeto de grande interesse da comunidade científica. Descobertas de drogas e pesquisas são realizadas na busca constante da resolução das disfunções sexuais, especialmente as masculinas. O uso indiscriminado de fitoterápicos com finalidades afrodisíacas é extremamente temerário, visto a falta de informações conclusivas de seus mecanismos de ação e, principalmente, seus efeitos sobre o processo espermatogênico. No Brasil, apesar da grande quantidade de plantas utilizadas como afrodisíacas na medicina popular, quase nada se sabe sobre sua ação e toxicologia.

O cipó-cravo, *Tynnanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae), é originário da Mata Atlântica sendo adotado popularmente como potente estimulante e afrodisíaco, além de ser também utilizado, há séculos, como medicamento caseiro para combater má

digestão e dores no estômago. Lainetti & Brito (1979) citam esta planta para tratamento de gases intestinais, diarréias e combate de vermes e Amorim et al. (1991) verificaram ação anti-helmíntica, reduzindo significativamente o número de oxiurídeos em camundongos. Carvalho et al. (2007) identificaram através de extração em água, etanol e diclorometano, os componentes fitoquímicos do caule de cipó-cravo como açúcares redutores, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, heterosídeos cardiotônicos, saponinas, triterpenos e esteróides.

O amplo emprego de *T. fasciculatus* na medicina tradicional e o seu uso popular são motivos suficientes para sua escolha como tema de estudos químicos, farmacológicos e clínicos, visando uma investigação mais detalhada das indicações citadas bem como de seus efeitos deletérios. Portanto, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo (*T. fasciculatus*) sobre o compartimento tubular de testículos de ratos Wistar adultos.

## **2 - Material e Métodos**

### *2.1 - Coleta e processamento do material botânico*

A coleta do cipó-cravo (*T. fasciculatus*) foi realizada no mês de janeiro de 2006, no setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. O material coletado foi identificado e autenticado por comparação com espécimes do Horto Botânico da UFV, onde espécime testemunho foi depositada (exsicata n° 30.074).

Fragmentos do caule do cipó-cravo foram secos em estufa, em temperatura de 37°C, para posterior moagem e preparo das infusões. As doses utilizadas neste trabalho foram baseadas em dados etnobotânicos e, para isto, porções de 10 e 20 gramas do

material triturado foram pesadas em balança de precisão (0,001g). Posteriormente, cada porção foi colocada em infusão durante 4 horas em 1 litro de água destilada em ponto de fervura. Após este período, o material foi filtrado e o restante sólido foi seco em estufa, na temperatura de 37°C, para cálculo da dose final presente no líquido.

## 2.2 - Animais e grupos experimentais

Os animais foram utilizados de acordo com o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório – National Research Council e em concordância com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório preconizados pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), em idade reprodutiva (120 dias), pesando em média 370 gramas e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFV. Os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais, constituindo três grupos experimentais (n=10 em cada grupo): um grupo controle que recebeu água destilada, e dois outros que receberam infusão do caule de cipó-cravo nas doses de 100 (CC100) e 200 (CC200) mg/animal/dia, respectivamente. O regime líquido foi fornecido na quantidade de 100 ml/dia, sendo anotado diariamente o volume consumido a fim de certificar que os animais estavam ingerindo a concentração diária mínima estabelecida de 40 ml. O regime sólido (ração) foi fornecido *ad libitum*.

Os animais foram mantidos durante o período experimental (54 dias consecutivos – ação crônica sobre o testículo) em condições controladas de temperatura (média de 24,7°C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro). Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados, seus dados biométricos registrados e utilizou-se o método de perfusão corporal, modificado de Sprando (1990), para fixação dos testículos. Para isto, foi feita uma abertura nas cavidades torácica e abdominal para

exposição do coração e dos órgãos reprodutivos. Uma agulha foi introduzida na aorta descendente, sendo usada solução salina (0,9%) contendo heparina sódica (Liquemine®) por 10 minutos, para retirada de sangue dos vasos sanguíneos. Após o clareamento dos vasos, a solução salina foi substituída pela solução fixadora de Karnovsky (4% paraformaldeído, 4% glutaraldeído em tampão fosfato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ , pH 7,4), perfundindo-se o animal por 15 minutos. Em seguida, foram retirados e pesados os testículos, epidídimos e glândulas vesiculares. Os órgãos coletados foram mantidos no mesmo fixador por 24 horas.

### *2.3 - Análises morfológicas e morfométricas*

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em resina a base de 2-hidroxietil metacrilato, seccionados na espessura de  $2 \mu\text{m}$  e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. O testículo contralateral foi dissecado e foi retirada a albugínea para calcular o percentual ocupado pela mesma no testículo.

Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

### *2.4 - Contagem da população celular dos túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero*

A estimativa da população dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo, classificado de acordo com o método da morfologia tubular (Swierstra, 1968; Courot et al., 1970; Ortavant et al., 1977; Curtis & Amann, 1981; Amann & Schanbacher, 1983) foi feita a partir de contagens dos núcleos das

células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Foram utilizadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal, sendo contados os núcleos dos seguintes tipos celulares:

- ↳ espermatogônias do tipo A (SPG A);
- ↳ espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/leptóteno (SPT I Pl/L);
- ↳ espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P);
- ↳ espermátides arredondadas (SPD Ar);

A contagem obtida para cada tipo celular foi corrigida para o diâmetro nuclear médio e a espessura do corte, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann & Almquist (1962):

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

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros de 30 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos utilizando-se programa de análise de imagem Image Pro Plus em objetiva de 20X. No caso das espermatogônias do tipo A, que apresentam núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor.

Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Em virtude disto, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente (Amann & Almquist, 1962).

Foi calculado o número de espermátides arredondadas por testículo considerando-se o número corrigido de espermátides arredondadas por secção

transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, permitindo avaliar a produção espermática diária. Para isto, calculou-se previamente o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo através da fórmula  $CT/testículo = (VTS/\pi R^2)/2$ , onde VTS = volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos ( $R$  = diâmetro tubular/2).

### 2.5 - Razões entre os números celulares

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli nos animais tratados e controle, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica, e entre estes números e o número corrigido de células de Sertoli no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram calculadas:

↗ espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno : espermatogônias do tipo A, obtendo-se o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (índice mitótico);

↗ espermátides arredondadas : espermatogônias do tipo A, obtendo-se o rendimento geral da espermatogênese;

↗ espermátides arredondadas : espermátocitos primários em paquíteno, obtendo-se o índice meiótico;

↗ espermátides arredondadas : população de células de Sertoli, obtendo-se o índice de célula de Sertoli que mede a eficiência desta célula;

↗ número total corrigido de células germinativas : população de células de Sertoli, obtendo-se a capacidade total de suporte da célula de Sertoli.

## 2.6 - Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo

Esta estimativa foi realizada a partir do número corrigido de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 e o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo (CT/testículo), segundo a fórmula empregada por Hochereau-De-Reviere & Lincoln (1978):

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

A partir deste cálculo e do peso bruto de um testículo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

## 2.7 - Cálculo da produção espermática diária total e por grama de testículo

O cálculo da produção espermática diária (PED) total foi feito a partir da histologia quantitativa dos testículos, segundo Amann & Almquist (1961) e Amann (1970), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\text{Volume total dos túbulos seminíferos} \times \text{Número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal de túbulo no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero}}{\text{Duração do ciclo do epitélio seminífero} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero} \times \text{espessura do corte histológico}}$$

Calculou-se previamente o volume total dos túbulos seminíferos através da fórmula  $VT = \% \text{ de túbulos} \times \text{volume líquido do testículo}$  e a área da secção transversal

do túbulo no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero através da fórmula  $A = \pi R^2$  (R = diâmetro tubular/2).

A duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos Wistar é de 12,8 dias (Van Haaster & De Rooij, 1993), sendo uma constante biológica espécie-específica.

Para se obter a produção espermática diária por grama de testículo, a produção espermática diária total foi dividida pelo peso bruto dos testículos. Os resultados são expressos em produção diária de espermátides total e por grama de testículo.

### 2.8 - Análises estatísticas

Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan foi usada para comparar médias e desvio-padrão entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## 3 - Resultados

O número corrigido de células espermatogênicas por secção de túbulo no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e o número de espermátides arredondadas por testículo encontram-se na Tabela 1. O número de espermatócitos primário em pré-leptóteno/leptóteno aumentou 10,05% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Os demais tipos celulares avaliados por secção de túbulo seminífero não apresentaram variação significativa entre os tratamentos. O número de espermátides arredondadas por testículo aumentou 22,56% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

As razões entre os números celulares para avaliação do processo espermatogênico e das células de Sertoli encontram-se na Tabela 2. Os índices calculados (índice mitótico, índice meiótico, rendimento geral da espermatogênese,

índice de eficiência da célula de Sertoli e capacidade total de suporte da célula de Sertoli) não apresentaram variação significativa entre os tratamentos.

Os resultados relativos ao número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo encontram-se na Tabela 3, não apresentando variação significativa entre os tratamentos.

Os cálculos da produção espermática diária total e por grama de testículo encontram-se na Tabela 4. A produção espermática diária total aumentou 22,48% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A produção espermática diária por grama de testículo aumentou 14,3% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

#### **4 - Discussão e conclusões**

O arranjo dos estádios do ciclo espermatogênico é segmentado e normalmente existe apenas um estágio por secção transversal de túbulo, como observado em roedores (Russell et al., 1990) exceto aves e primatas do novo mundo (Paula, 1999).

A quantificação da população dos diferentes tipos de células germinativas e de células de Sertoli, por secção transversal de túbulo seminífero nos diversos estádios do ciclo, permite analisar funcionalmente o processo espermatogênico e estimar a produção espermática, além de propiciar conhecimento da cinética da espermatogênese (Clermont, 1972; França, 1991).

Ratos machos tratados com extrato de *Barleria prionitis* (Acanthaceae) apresentaram redução na população de várias células espermatogênicas, afetando sua eficiência reprodutiva por alteração da espermatogênese (Verma et al., 2005). O tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* na sua maior dose (CC200) provocou aumento do número de espermátocitos primários na fase de pré-leptóteno/leptóteno. Os espermátocitos primários são formados após o término das

divisões mitóticas dos diversos tipos de espermatogônias e do crescimento após a formação da espermatogônia do tipo B. Este aumento no número de espermatócitos pode estar relacionado à redução de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa, reduzindo degenerações que ocorrem nas conversões celulares, de espermatogônias A até a formação de espermatócitos primários em pré-leptóteno. Este aumento refletiu em aumento significativo no número de espermátides arredondadas por testículo em animais tratados com a dose de 200mg.

Somente recentemente a população de células germinativas tem sido analisada morfometricamente para se conseguir determinar quais os principais parâmetros que estão envolvidos durante o longo processo da espermatogênese (França & Russell, 1998). Há na literatura pouca descrição sobre medidas de volumes e de áreas de superfície das células germinativas que possam ser aplicadas funcionalmente para o ciclo o epitélio seminífero.

As razões entre os diferentes tipos de células germinativas constituem um modo bastante seguro de se analisar a eficiência do processo espermatogênico permitindo comparações entre diferentes espécies (Paula, 1999). São utilizados três índices para avaliação das diferentes fases da espermatogênese: a) o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, que quantifica o grau de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa; b) o rendimento meiótico, que avalia a eficiência das duas divisões meióticas e c) o rendimento geral da espermatogênese, que avalia a eficiência do processo espermatogênico como um todo (Paula, 1999). As razões entre os números celulares calculadas para avaliação do processo espermatogênico apresentaram os maiores resultados em animais tratados com infusão do caule de *T. fasciculatus* na dose de 200mg, apesar de não diferirem significativamente entre os grupos experimentais. Estes dados podem estar associados à redução de perdas celulares que

fazem parte do processo espermatogênico. Esta redução de perdas celulares pode estar relacionada a efeito protetor do cipó-cravo sobre as células espermatogênicas. Pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) relatam que o cipó-cravo *T. fasciculatus*, além de possuir propriedade analgésica, também apresenta ação antioxidante avaliada em teste “in vitro”, o que sugere que a planta pode ter componentes que inibem a ação de radicais livres produzidos durante a queima de oxigênio em nossas células e responsáveis pelo envelhecimento precoce (Agência Fapesp, 2003).

As interações entre as células de Sertoli e as células germinativas são cruciais para a manutenção da produção espermática normal. A população de células de Sertoli manteve-se constante nos grupos experimentais, estando de acordo com França & Russel (1998) que consideram que as células de Sertoli não mais se dividem após o período perinatal na maioria dos animais.

A razão célula de Sertoli : espermátide (índice da célula de Sertoli) é considerado um parâmetro bastante confiável para se avaliar a eficiência e função da célula de Sertoli, sendo um fator determinante da produção espermática. Este índice varia consideravelmente entre as espécies, estando os valores encontrados no presente trabalho dentro da faixa normal para a maioria dos roedores (Parreira, 1990; Rocha et al., 1999). A capacidade total de suporte da célula de Sertoli (número de células germinativas suportadas por uma célula de Sertoli) é o melhor reflexo da eficiência funcional desta célula, além de ser muito variada e constante para cada espécie (França & Russel, 1998). Os índices da célula de Sertoli avaliados não mostraram diferença significativa entre os grupos experimentais, apesar dos melhores resultados serem observados em animais tratados com infusão do caule de *T. fasciculatus* na dose de 200mg.

A eficiência da espermatogênese é medida através da produção espermática diária (PED) total e por grama de testículo. Em ratos Wistar, considerada espécie com alta eficiência espermatogênica, a PED por grama de testículo é de 20 a 24x10<sup>6</sup> espermátides (Dadoune & Demoulin, 1993; Johnson, 1995). Os resultados da PED por grama de testículo do presente trabalho estão dentro dos padrões de normalidade para a espécie. Animais tratados com *T. fasciculatus* na dose de 200mg apresentaram valores da PED total e PED por grama de testículo significativamente superiores aos demais grupos experimentais, indicando aumento na produção espermática. Aumento na produção de espermatozóides foi observado em ratos tratados com *Butea superba* (Manosroi et al., 2006) e com *Satureja khuzestanica* (Haeri et al., 2006).

A PED está relacionada ao número de espermátides arredondadas e ao comprimento total dos túbulos seminíferos. O aumento do comprimento total dos túbulos seminíferos (calculado previamente) e o aumento do número de espermátides arredondadas por testículo em animais tratados com a dose de 200mg confirmam aumento na quantidade de espermatozóides produzidos. O aumento na PED reflete nos índices calculados para células de Sertoli (índice de eficiência da célula de Sertoli e capacidade total de suporte da célula de Sertoli), que embora não significativos, apresentaram aumento em animais tratados com a dose de 200mg, o que foi suficiente para suportar o aumento na produção espermática.

Os dados apresentados permitem inferir que o tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus*, em sua maior dose (200mg), promoveu aumento significativo na produção espermática diária total e por grama de testículo, refletindo maior produção espermatogênica.

## **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa e à Fundação Fafile de Carangola (FAFILE/UEMG) pelo apoio e licença das atividades acadêmicas.

## **5 - Referências**

Agência FAPESP, Boletim de Notícias de 23/12/2003.

Amann, R.P., 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). The testis. New York, Academic Press, v.1, cap.7, pp.433-482.

Amann, R.P., Almquist, J.O., 1961. Reproductive capacity of dairy bulls. I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. Journal Dairy Science 44, 1537-1543.

Amann, R.P., Almquist, J.O., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. Journal Dairy Science 45, 774-781.

Amann, R.P., Schanbacher, B.D., 1983. Physiology of male reproduction. Journal Animal Science 57(2), 380-403.

Amorim, A., Borba, H.R., Amano, L.M., 1991. Ação anti-helmíntica de plantas IV. Influência da casca do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers; Bignoniaceae) na eliminação de *Vampirolepis nana* e de oxiurídeos em camundongos. Revista Brasileira de Farmacologia 72(4), 92-94.

Carvalho, C.A., Oliveira, T.G., Manfré, R.V.R., Andrade, D.C., Matta, S.L.P., Silva, M.B., Rosa, M.B., 2007. Estudo fitoquímico de *Tynnanthus fasciculatus* – Bignoniaceae. In: 47º Congresso Brasileiro de Olericultura, Porto Seguro. Anais do Congresso Brasileiro de Olericultura, 25, 1-176.

Clermont, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 52(1), 198-236.

Courot, M., Hochereau-De-Reviers, M.T., Ortavant, R., 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandenmark, N.L. (ed). *The testis*. New York, Academic Press, v.1, cap.6, pp. 339-432.

Curtis, S.K., Amann, R.P., 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science* 53, 1645-1657.

Daduone, J.P., Demuolin, A., 1993. Structure and functions of the testis. In: Thibault, C., Levasseur, M., Hunter, R.H.F. (Org.). *Reproduction in mammals and man*. Paris, Ellipses, cap.13, pp. 227-250.

França, L.R., 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 180p. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F. and Regadera, J. (Org.). *Male reproduction-a multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, cap 16, pp.198-219.

Gullo, C. & Pereira, C., 2001. A cura no jardim. *Revista Isto É* 1513, 72-78.

Haeri, S., Minaie, B., Amin, G., Nikfar, S., Khorasani, R., Esmaily, H., Salehnia, A., Abdollahi, M., 2006. Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on male rat fertility. *Fitoterapia* 77, 495-499.

Hochereau-De-Reviere, M.T., Lincoln, G.A., 1978. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 209-213.

Johnson, L., 1995. Efficiency of spermatogenesis. *Microscopy Research and Technique* 32(5), 385-422.

Lainetti, R. & Brito, N.R.S., 1979. A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras. Rio de Janeiro, Editora TecnoPrint Ltda.

Manosroi, A., Sanphet, K., Saowakon, S., Aritajit, S., Manosroi, J., 2006. Effects of *Butea superba* on reproductive systems of rats. *Fitoterapia* 77, 435-438.

Moreira, R.A., Acúrio, F.A., Brandão, M.G.L., 2001. Interesse de farmacêuticos, envolvidos em dispensação, por plantas medicinais e fitoterapia. *Revista Pharmacia Brasileira* 25, 72-75.

Ortavant, R., Courot, M., Hochereau-De-Reviere, M.T., 1997. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds). *Reproduction in domestic animals*. 3rd Ed. New York, Academic Press, cap. 8, pp. 203-227.

Paula, T.A.R., 1999. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Parreira, G.G., 1990. Morfologia e variação sazonal da atividade dos testículos e órgãos genitais acessórios de *Bolomys lasiurus* Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae). Belo Horizonte: UFMG, 97p. Tese (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Rocha, D.C.M., Debeljuk, L., França, L.R., 1999. Exposure to constant light during testis development increase daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue & Cell* 31, 372-379.

Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D. (eds). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, cap. 1, pp. 1-40.

Sprando, R.L., 1990. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., (eds). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, pp. 277-280.

Swierstra, E.E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoa transit through the epididymis. *The Anatomical Records* 161, 171-186.

Van Haaster, L.H. & De Rooij, D.G., 1993. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat. *Biology of Reproduction* 49, 1229-1235.

Verma, P.K., Sharma, A., Joshi, S.C., Gupta, R.S., Dixit, V.P., 2005. Effect of isolated fractions of *Barleria prionitis* root methanolic extract on reproductive function of male rats: preliminary study. *Fitoterapia* 76, 428-432.

Tabela 1

Número corrigido de células espermatogênicas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e número de espermátides arredondadas por testículo (SPD Ar/T) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Tratamentos	SPGA	SPTI PI/L	SPTI P	SPD Ar	SPD Ar/T ( $\times 10^7$ )
Controle	1,29 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	17,61 $\pm$ 1,91 <sup>b</sup>	21,85 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	64,01 $\pm$ 5,53 <sup>a</sup>	55,4 $\pm$ 11,5 <sup>b</sup>
CC 100	1,19 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	18,93 $\pm$ 1,84 <sup>a,b</sup>	21,05 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>	65,7 $\pm$ 7,19 <sup>a</sup>	51,8 $\pm$ 8,1 <sup>b</sup>
CC 200	1,14 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	19,38 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	22,25 $\pm$ 1,79 <sup>a</sup>	69,97 $\pm$ 6,52 <sup>a</sup>	67,9 $\pm$ 6,1 <sup>a</sup>

SPGA = espermatogônia A; SPTI PI/L = espermátocito primário em pré-leptóteno/leptóteno; SPTI P = espermátocito primário em paquíteno; SPD Ar = espermátide arredondada

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). (n=10)

Tabela 2

Razões entre os números celulares para avaliação do processo espermatogênico e das células de Sertoli – Índice mitótico; Índice meiótico; Rendimento geral da espermatogênese; Índice de eficiência da célula de Sertoli e Capacidade total de suporte da célula de Sertoli em testículos de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

<b>Tratamentos</b>	<b>Índice mitótico</b>	<b>Índice meiótico</b>	<b>Rendimento geral</b>	<b>Índice da célula de Sertoli</b>	<b>Capacidade suporte Sertoli</b>
Controle	14,45 $\pm$ 4,05 <sup>a</sup>	2,95 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	52,86 $\pm$ 15,03 <sup>a</sup>	10,96 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	17,91 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>
CC 100	16,81 $\pm$ 4,56 <sup>a</sup>	3,12 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	58,4 $\pm$ 16,34 <sup>a</sup>	10,65 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	17,36 $\pm$ 2,31 <sup>a</sup>
CC 200	17,99 $\pm$ 4,56 <sup>a</sup>	3,15 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	65,11 $\pm$ 17,63 <sup>a</sup>	11,89 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	19,19 $\pm$ 2,16 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (p<0,05). (n=10)

Tabela 3

Morfometria de Sertoli – Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Tratamentos	Número por testículo (x10 <sup>6</sup> )	Número por grama de testículo (x10 <sup>6</sup> )
Controle	51,37 $\pm$ 11,87 <sup>a</sup>	33,64 $\pm$ 6,65 <sup>a</sup>
CC 100	49,17 $\pm$ 8,83 <sup>a</sup>	32,32 $\pm$ 6,38 <sup>a</sup>
CC 200	57,69 $\pm$ 7,84 <sup>a</sup>	35,22 $\pm$ 5,98 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (p<0,05). (n=10)

Tabela 4

Produção espermática diária total (PED) e produção espermática diária por grama de testículo (PED/gT) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

<b>Tratamentos</b>	<b>PED (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>PED/gT (x10<sup>6</sup>)</b>
Controle	86,71 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	28,39 $\pm$ 4,71 <sup>b</sup>
CC 100	81,02 $\pm$ 12,7 <sup>b</sup>	26,52 $\pm$ 4,07 <sup>b</sup>
CC 200	106,21 $\pm$ 9,52 <sup>a</sup>	32,45 $\pm$ 4,61 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (p<0,05). (n=10)

**3. Morfometria do compartimento intertubular de ratos Wistar tratados com infusão do caule de cipó-cravo *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae)**

**Resumo**

Nos últimos anos tem aumentado a procura de substâncias de origem vegetal na busca constante da resolução das disfunções sexuais, especialmente masculinas. O cipó-cravo, *Tynnanthus fasciculatus*, é uma planta utilizada há séculos como medicamento caseiro para combater má digestão e dores no estômago, e também adotada popularmente como estimulante geral e afrodisíaco. Foram avaliados os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo no compartimento intertubular de testículos de ratos Wistar adultos. Utilizaram-se 30 ratos machos em idade reprodutiva, divididos em 3 grupos, sendo um grupo controle, que recebeu água destilada e dois que receberam infusão do caule de cipó-cravo nas doses de 100 e 200mg/animal/dia, respectivamente. O tratamento com *T. fasciculatus* reduziu a proporção volumétrica e volume de tecido conjuntivo e proporcionou aumento de macrófagos do intertúbulo. Na dose de 100mg, observou-se aumento do volume das células de Leydig por testículo, que pode ser justificado pelo aumento do número de células de Leydig e confirmado pelo maior valor do índice Leydigossomático. Estes resultados podem estar associados a interações celulares, onde fatores parácrinos, inibitórios ou estimulatórios, produzidos principalmente pelas células de Leydig e macrófagos podem estar atuando no parênquima testicular.

**Palavras-chave:** célula de Leydig, índice Leydigossomático, intertúbulo, macrófago

## **1 - Introdução**

A flora medicinal constitui um arsenal terapêutico de enorme importância. Há vários séculos as plantas vêm sendo consideradas fontes medicamentosas, empregadas tanto em preparações tradicionais (chás, sucos, xaropes, cataplasmas, tinturas, unguentos) quanto, mais recentemente, na forma de princípios ativos puros e de medicamentos fitoterápicos (Pitman, 1996).

A medicina tradicional constitui o mais importante, e em alguns casos o único recurso disponível para a população carente de várias partes do mundo (Akerele, 1987), inclusive do Brasil. Partindo do princípio que mais da metade dos habitantes do planeta vive em estado de carência, pode-se estimar a importância do conhecimento de práticas alternativas à medicina, que se encontra atualmente fora de alcance de grande parcela da população.

O uso de plantas medicinais é a mais forte corrente de tratamento de diversos males pela medicina popular, com destaque para questões relacionadas à sexualidade humana, especialmente a masculina. Várias plantas são utilizadas como estimulantes e afrodisíacos sendo indicadas nos casos de disfunção erétil, causas de infertilidade, ejaculação precoce, diminuição da libido e outros aspectos relacionados à melhora do desempenho e qualidade da atividade sexual.

No Brasil, apesar da grande quantidade de plantas utilizadas como afrodisíacas, quase nada se sabe sobre sua ação e toxicologia. Pesquisas científicas devem ser realizadas com o objetivo de garantir a efetividade e segurança na utilização do fitoterápico (Capasso et al., 2000). Farnsworth (1990) destaca que a etnobotânica, a etnomedicina e a medicina popular podem fornecer informações que seriam usadas como fator de pré-seleção de plantas para estudos farmacológicos experimentais.

O testículo de mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico. As células de Leydig estão localizadas no compartimento intertubular, juntamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular diversificada, constituída por fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Setchell, 1991). A testosterona produzida pelas células de Leydig é responsável pela espermatogênese, pelo desenvolvimento e manutenção de características sexuais secundárias e pelas características comportamentais (O'Donnell et al., 2001).

O cipó-cravo, *Tynnanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae), é originário da Mata Atlântica e é adotado popularmente como forte estimulante e afrodisíaco e também utilizado há séculos como medicamento caseiro para combater má digestão e dores no estômago. Lainetti & Brito (1979) citam esta planta para tratamento de gases intestinais, diarréias e combate de vermes e Amorim et al. (1991) verificaram ação anti-helmíntica, reduzindo significativamente o número de oxiurídeos em camundongos.

Carvalho et al. (2007) identificaram através de extração em água, etanol e diclorometano, os componentes fitoquímicos do caule de cipó-cravo como açúcares redutores, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, heterosídeos cardiotônicos, saponinas, triterpenos e esteróides

O amplo emprego de *T. fasciculatus* na medicina tradicional e o seu uso popular são motivos suficientes para sua escolha como tema de estudos químicos, farmacológicos e clínicos, visando uma investigação mais detalhada das indicações citadas, bem como de seus efeitos sobre os órgãos reprodutivos masculinos. Portanto, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos da infusão do caule de cipó-cravo (*T. fasciculatus*) sobre o compartimento intertubular de testículos de ratos Wistar adultos.

## **2 - Material e Métodos**

### *2.1 - Coleta e processamento do material botânico*

A coleta do cipó-cravo (*T. fasciculatus*) foi realizada no mês de janeiro de 2006, no setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. O material coletado foi identificado e autenticado por comparação com espécimes do Horto Botânico da UFV, onde espécime testemunho foi depositada (exsicata n<sup>o</sup> 30.074).

Fragmentos do caule de cipó-cravo foram secos em estufa, em temperatura de 37°C, para posterior moagem e preparo das infusões. As doses utilizadas neste trabalho foram baseadas em dados etnobotânicos e, para isto, porções de 10 e 20 gramas do material triturado foram pesadas em balança de precisão (0,001g). Posteriormente, cada porção foi colocada em infusão durante 4 horas em 1 litro de água destilada em ponto de fervura. Após este período, o material foi filtrado e o restante sólido foi seco em estufa com temperatura de 37°C para cálculo da dose final presente no líquido.

### *2.2 - Animais e grupos experimentais*

Os animais foram utilizados de acordo com o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório – National Research Council e em concordância com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório preconizados pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), em idade reprodutiva (120 dias), pesando em média 370 gramas e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFV. Os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais, constituindo três grupos experimentais (n=10 em cada grupo): um grupo controle que

recebeu água destilada, e dois outros que receberam infusão do caule de cipó-cravo nas doses de 100 (CC100) e 200 (CC200) mg/animal/dia, respectivamente. O regime líquido foi fornecido na quantidade de 100 ml/dia, sendo anotado diariamente o volume consumido a fim de certificar que os animais estavam ingerindo a concentração diária mínima estabelecida de 40 ml. O regime sólido (ração) foi fornecido *ad libitum*.

Os animais foram mantidos durante o período experimental (54 dias consecutivos – ação crônica sobre o testículo) em condições controladas de temperatura (média de 24,7°C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro). Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados, seus dados biométricos registrados e utilizou-se o método de perfusão corporal, modificado de Sprando (1990), para fixação dos testículos. Para isto, foi feita uma abertura nas cavidades torácica e abdominal para exposição do coração e dos órgãos reprodutivos. Uma agulha foi introduzida na aorta descendente, sendo usada solução salina (0,9%) contendo heparina sódica (Liquemine®) por 10 minutos, para retirada de sangue dos vasos sanguíneos. Após o clareamento dos vasos, a solução salina foi substituída pela solução fixadora de Karnovsky (4% paraformaldeído, 4% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 molL<sup>-1</sup>, pH 7,4), perfundindo-se o animal por 15 minutos. Em seguida, foram retirados e pesados os testículos, epidídimos e glândulas vesiculares. Os órgãos coletados foram mantidos no mesmo fixador por 24 horas.

### 2.3 - Análises morfológicas e morfométricas

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato, seccionados na espessura de 2 µm e corados com azul de toluidina - borato

de sódio 1%. O testículo contralateral foi dissecado e foi retirada a albugínea para calcular o percentual ocupado pela mesma no testículo.

Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

#### *2.4 - Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo*

Do compartimento intertubular foram investigadas as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos sanguíneos e linfáticos, obtendo-se as proporções volumétricas entre estes componentes. Para isto, foram registrados 2500 pontos (grade 30x30) projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal, utilizando objetiva de 20X.

O volume de cada componente do intertúbulo por testículo, expresso em ml, foi estimado através da multiplicação do percentual ocupado pelos mesmos nos testículos multiplicado pelo peso do parênquima de um testículo e dividido por 100. O cálculo do percentual ocupado pelos elementos do intertúbulo nos testículos foi obtido multiplicando-se a proporção volumétrica de intertúbulo pela proporção volumétrica do elemento/100. Para o cálculo do peso do parênquima testicular, subtraiu-se do peso bruto do testículo o peso da albugínea. Como a densidade do testículo de mamíferos está em torno de 1 (Johnson & Neaves, 1981; França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

#### *2.5 - Morfometria da célula de Leydig*

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi medido utilizando objetiva de 20X. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal utilizando-se o programa de análise de imagens Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics). Foram

utilizados núcleos que apresentaram contorno esférico, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

Para o cálculo da proporção entre núcleo e citoplasma, quinhentos pontos aleatoriamente distribuídos sobre o citoplasma e núcleo das células de Leydig foram contados por animal, em imagens capturadas, utilizando-se objetiva de 20X (grade 10X10).

Foram calculados os volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) nuclear, citoplasmático e de cada célula de Leydig por animal, utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Volume nuclear} = 4/3 \pi R^3, \text{ onde } R = \text{raio nuclear}$$

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

Cálculos do número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foram feitos utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Número de células de Leydig por testículo} = \frac{\text{volume que a célula de Leydig ocupa por testículo } (\mu\text{m}^3)}{\text{volume de uma célula de Leydig } (\mu\text{m}^3)}$$

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

Onde:

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

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

O índice Leydigossomático (ILS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento, em células de Leydig, com relação ao peso corporal, sendo calculado através da fórmula:

**ILS** = volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos / PC x 100, onde PC=peso corporal

## 2.6 - Análises estatísticas

Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan foi usada para comparar médias e desvio-padrão entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## 3 - Resultados

Os percentuais dos componentes do intertúbulo encontram-se na Tabela 1. A proporção volumétrica de tecido conjuntivo reduziu 52,33% e 77,88% nos grupos CC100 e CC200, respectivamente, em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A proporção volumétrica de macrófagos aumentou 103,87% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Os demais componentes avaliados não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

O volume (ml) dos elementos do intertúbulo por testículo encontra-se na Tabela 2. O volume das células de Leydig aumentou 33,33% no grupo CC100 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e o volume de macrófagos aumentou 50% e 75% nos grupos CC100 e CC200, respectivamente, em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Os volumes de vasos sanguíneos e espaço linfático não apresentaram variação significativa entre os

tratamentos. Por outro lado, o volume de tecido conjuntivo reduziu 77,77% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

Os resultados dos diâmetros nucleares e proporção entre núcleo e citoplasma das células de Leydig encontram-se na Tabela 3. A proporção de núcleo da célula de Leydig aumentou 9,6% e reduziu 3,38% a proporção de citoplasma de Leydig no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Medidas dos diâmetros nucleares da célula de Leydig não apresentaram variação significativa entre os tratamentos.

Medidas dos volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) encontram-se na Tabela 4. O volume citoplasmático reduziu 22,23% no grupo CC200 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Medidas dos volumes nuclear e de uma célula de Leydig não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

O número de células de Leydig por testículo, por grama de testículo, o índice Leydigossomático (ILS) e os pesos da glândula vesicular e epidídimo encontram-se na Tabela 5. O número de células de Leydig por grama de testículo aumentou 38,63% e o ILS aumentou 35,29% no grupo CC100 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). O número de células de Leydig por testículo, o peso da glândula vesicular e do epidídimo não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

#### **4 - Discussão**

A porção endócrina do testículo de mamíferos é representada pelas células de Leydig que formam o compartimento intertubular juntamente com outros componentes conjuntivos como macrófagos e fibroblastos, além de vasos sanguíneos e linfáticos.

Além do já conhecido controle endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, um elaborado sistema de comunicação intercelular é desenvolvido no testículo para assegurar o perfeito funcionamento do processo espermatogênico (Roser, 2000). Vários

trabalhos descrevem relações entre as células de Leydig e os componentes testiculares como os macrófagos, células mióides e células de Sertoli (Skinner, 1991; Ichihara et al., 2001; Hales, 2002).

Existe grande variação entre as espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (França & Russell, 1998; Godinho, 1999; Paula, 1999; Gomes, 2007). O tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* reduziu a proporção volumétrica e o volume de tecido conjuntivo e aumentou a população de macrófagos do intertúbulo. Gomes (2007) verificou redução dos macrófagos e das células de Leydig em ratos tratados com catuaba (*Trichilia catigua*). O macrófago é uma célula que está em íntima associação com as células de Leydig. Entende-se que fatores secretados pelos macrófagos controlam de modo parácrino a atividade esteroidogênica e o desenvolvimento das células de Leydig (Hales, 1996). Citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1) e fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) secretados pelo macrófago inibem a atividade esteroidogênica das células de Leydig adultas (Hales, 1996). Outros fatores (citocinas e fatores de crescimento) secretados pelos macrófagos estimulam a proliferação e diferenciação de células de Leydig imaturas, sugerindo que os macrófagos são essenciais para o desenvolvimento normal das células de Leydig (Hales, 1996). Hutson et al. (1996) sugeriram que macrófagos testiculares secretam um fator lipofílico que é capaz de estimular a produção de testosterona pelas células de Leydig. Este fator pode estimular células de Leydig cultivadas a produzirem mais testosterona do que quando estas células são estimuladas pelo LH (Hutson, 1998).

O número de macrófagos testiculares aumenta consideravelmente do nascimento até a maturidade sexual. Aparentemente, o número de macrófagos pode também aumentar no animal adulto e sua taxa de proliferação está sob o controle da hipófise

(Hales, 1996). Enquanto o número de macrófagos da maioria dos órgãos aumenta pela migração de monócitos sanguíneos para os tecidos periféricos, o número de macrófagos testicular aumenta principalmente por proliferação, mas este aumento não é mediado pela testosterona (Raburn et al., 1993). Segundo Hutson (1998), as células de Leydig produzem um fator mitogênico regulado pelo LH (diferente da testosterona) que estimula a proliferação de macrófagos vizinhos, direta ou indiretamente, durante a maturação pós-natal e no indivíduo adulto, o que poderia ser responsável pelo aumento do número e volume de macrófagos em animais tratados com infusão do caule de *T. fasciculatus*.

O tratamento com *T. fasciculatus* na dose de 100mg proporcionou aumento significativo do volume das células de Leydig por testículo. Este aumento volumétrico pode ser justificado pelo aumento do número de células de Leydig por testículo ( $p=0,05$ ) e por grama de testículo ( $p<0,05$ ). Ratos tratados com catuaba (*Trichilia catigua*) apresentaram redução em todos os volumes calculados para células de Leydig (Gomes, 2007).

O desenvolvimento pós-natal das células de Leydig envolve proliferação celular, diferenciação morfológica e aquisição da capacidade de produção de testosterona. O LH é essencial para a proliferação e diferenciação das células de Leydig, contribuindo no estabelecimento de organelas citoplasmáticas requeridas para a função esteroidogênica destas células (Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001). A proliferação de células de Leydig também é estimulada por fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), por aumentar a sensibilidade das células de Leydig progenitoras ao LH, e por fatores secretados pelas células de Sertoli e por macrófagos (Ge et al., 1996). Apesar de pouco documentado, ocorrem mitoses de células de Leydig em animais adultos (Russell et al., 1995).

Existem dois possíveis mecanismos de ação dos compostos sobre as células de Leydig: em receptores da célula de Leydig, sem alteração nos níveis séricos de hormônios reprodutivos (ação androgênica indireta); ou ação androgênica, agindo no hipotálamo, aumentando a secreção de fatores de liberação de gonadotrofinas (GnRH) ou na hipófise, estimulando a secreção de LH que pode agir direta ou indiretamente nas células de Leydig. Esta ação indireta pode ser mediada por macrófagos, sendo que o aumento do número e volume destas células em ratos tratados com *T. fasciculatus* pode estar influenciando a atividade proliferativa das células de Leydig, que respondem de forma diferente a fatores parácrinos (inibitórios ou estimulatórios) secretados pelos macrófagos. *Butea superba* é uma planta utilizada para tratamento de impotência que apresenta compostos com atividade androgênica (Manosroi et al., 2006). Bogani et al. (2006) indicam que o potencial afrodisíaco de *Lepidium meyenii* (maca) não está associado a efeito androgênico direto.

A avaliação do índice Leydigossomático indica que animais tratados com infusão do caule de *T. fasciculatus*, na dose de 100mg, apresentaram maior proporção de peso corporal alocado em células de Leydig, justificado pelo aumento do número de células de Leydig por testículo ( $p=0,05$ ) e por grama de testículo ( $p<0,05$ ).

Células de Leydig apresentaram aumento do núcleo e redução do citoplasma em animais tratados com *T. fasciculatus* na maior dose (200mg) alterando, portanto, a relação nucleoplasmática freqüente em ratos Wistar. Avaliando-se os volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig, observa-se que todos apresentaram redução, apesar de somente o volume citoplasmático ser estatisticamente significativo em animais tratados com a dose de 200mg. Castro et al. (2002) propõem que, em coelhos, há correlação altamente significativa do percentual do núcleo e do número de células de Leydig por grama de testículo, com os níveis plasmáticos e testiculares de testosterona.

Costa & Paula (2006) sugerem que, em capivaras, a produção de testosterona varia de acordo com parâmetros que não dependem do número ou proporção das células de Leydig nos testículos. Estudos correlacionando estrutura e funções das células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar testosterona do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo (Ewing et al., 1979). Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (Zirkin et al., 1980). Em consequência da redução do volume citoplasmático das células de Leydig em animais tratados com *T. fasciculatus* na dose de 200mg, são necessários estudos de morfometria de organelas para constatar se houve redução do volume dessas organelas acompanhando a redução do volume citoplasmático.

O tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* aparentemente não alterou os níveis plasmáticos de testosterona, o que pode ser comprovado pelos pesos da glândula vesicular e do epidídimo, órgãos sabidamente andrógeno-dependentes (Chauhan et al., 2007), que não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* na dose de 200mg proporcionou aumento da produção espermática, produzindo efeitos positivos sobre o compartimento tubular dos testículos de ratos Wistar adultos. Neste trabalho, a dose de 200mg parece exercer efeito tóxico para a linhagem das células de Leydig. Portanto, a mesma dose da infusão do caule de *T. fasciculatus* pode estar atuando de forma diferenciada nos tipos celulares constituintes do parênquima testicular.

Os dados apresentados permitem sugerir que o tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus*, promoveu aumento da proporção e volume de macrófagos e redução de tecido conjuntivo, aumento do volume e número de células de Leydig por grama de testículo na dose de 100mg, sendo confirmado pelo maior valor do índice Leydigossomático. A maioria dos estudos relacionados à regulação da esteroidogênese tem sido direcionada para eventos endócrinos. No entanto, maior atenção deve ser dada à existência de fatores parácrinos que são essenciais e altamente eficazes no processo esteroidogênico. Portanto, estudos mais detalhados são necessários para determinar como estes fatores, inibitórios ou estimulatórios, são sincronizados para se ter a regulação da secreção de testosterona em condições fisiológicas e patológicas.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa e à Fundação Fafile de Carangola (FAFILE/UEMG) pelo apoio e licença das atividades acadêmicas.

### **5 - Referências**

- Akerele O. 1987. The best of both worlds: bringing traditional medicine up to date. *Social Science Medicine* **24(2)**: 177-181.
- Amorim A, Borba HR, Amano LM. 1991. Ação anti-helmíntica de plantas IV. Influência da casca do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers; Bignoniaceae) na eliminação de *Vampirolepis nana* e de oxiurídeos em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacologia* **72(4)**: 92-94.

Bogani P, Simonini F, Iriti M, Rossoni M, Faoro F, Poletti A, Visioli F. 2006. *Lepidium meyenii* (Maca) does not exert direct androgenic activities. *Journal of Ethnopharmacology* **104**: 415-417.

Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia* **71**: S58-S65.

Carvalho CA, Oliveira TG, Manfré RVR, Andrade DC, Matta SLP, Silva MB, Rosa MB. 2007. Estudo fitoquímico de *Tynnanthus fasciculatus* – Bignoniaceae. In: 47º Congresso Brasileiro de Olericultura, Porto Seguro. *Anais do Congresso Brasileiro de Olericultura* **25**: 1-176.

Castro ACS, Berndtson WE, Cardoso FM. 2002. 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.

Chauhan A, Agarwal M, Kushwaha S, Mutreja A. 2007. Suppression of fertility in male albino rats following the administration of 50% ethanolic extract of *Aegle marmelos*. *Contraception* **76**: 474-481.

Costa DS, Paula TAR. 2006. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **58(6)**: 1086-1091.

Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, Kromann N, Peters C, Ruiz-Bravo N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology* **105(5)**: 1135-1142.

Farnsworth NR. 1990. The role of ethnopharmacology in drug development. *Ciba Foundation Symposium* **152**: 2-11.

França LR. 1991. *Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Tese (Doutorado). 180p.

França LR, Russell LD. 1998. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction- a multidisciplinary overview*, Martinez-Garcia F & Regadera J (org). Madrid, Churchill Communications; 198-219.

Ge RS, Shan LX, Hardy MP. 1996. Pubertal development of Leydig cells. In: *The Leydig cell*. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds). Vienna, Illinois: Cache River Press; 159-174

Godinho CL. 1999. *Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (Felis domestica), sexualmente maduros*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Dissertação (mestrado). 74p.

Gomes MLM. 2007. *Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (Trichilia catigua A. Juss. MELIACEAE)*. Viçosa: Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Dissertação (mestrado). 38p.

Hales BD. 1996. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: *The Leydig Cell*, Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds). Vienna, Illinois: Cache River Press; 451-465.

- Hales BD. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology* **57**: 3-18.
- Hutson JC. 1998. Interactions between testicular macrophages and Leydig cells. *Journal of Andrology* **19(4)**: 394-398.
- Hutson JC, Garner C, Doris PA. 1996. Purification and characterization of a lipophilic factor from testicular macrophages that stimulates testosterone secretion. *Journal of Andrology* **17**: 502-508.
- Ichihara I, Kawamura H, Nakano T, Pelliniemi LJ. 2001. Ultrastructural, morphometric, and hormonal analysis of the effects of testosterone treatment on Leydig cells and other interstitial cells in young rats. *Annals of Anatomy* **183**: 413-426.
- Johnson L, Neaves WB. 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction* **24**: 703-712.
- Lainetti R, Brito NRS. 1979. *A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras*. Rio de Janeiro, Editora Tecnoprint Ltda.
- Manosroi A, Sanphet K, Saowakon S, Aritajat S, Manosroi J. 2006. Effects of *Butea superba* on reproductive systems of rats. *Fitoterapia* **77**: 435-438.
- Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne S. 2001. Differentiation of adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction* **65**: 660-671.
- O'Donnel L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **22(3)**: 289-318.

Paula TAR. 1999. *Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas* (Hydrochoerus hydrochaeris). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Tese (doutorado). 84p.

Pitman V. 1996. *Fitoterapia. As plantas medicinais e a saúde*. Lisboa, Estampa.

Raburn DJ, Reinhart AJ, Hutson JC. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. *Journal of Reproductive Immunology* **24**: 139-151.

Roser JF. 2000. Reproductive endocrinology of the stallion. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, Samper JC (ed). Saunders Company, Philadelphia; 123-132.

Russell LD, França LR, Hess R, Cooke P. 1995. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue & Cell* **27**: 105-128.

Setchell BP. 1991. Male reproductive organs and semen. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Cupps PT. San Diego: Academic Press, 4th ed; 221-250.

Skinner MK. 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews* **12**: 45-77.

Sprando RL. 1990. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (eds). Cache River Press, Clearwater; 277-280.

Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC. 1980. Testosterone secretion by rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cells ultrastructure. *Endocrinology* **107**: 1867-1874.

Tabela 1

Proporção volumétrica (%) dos componentes do intertúbulo em testículos de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

<b>Tratamentos</b>	<b>Células de Leydig</b>	<b>Vasos sanguíneos</b>	<b>Espaço linfático</b>	<b>Tecido conjuntivo</b>	<b>Macrófagos</b>
Controle	18,16 $\pm$ 4,96 <sup>a</sup>	14,62 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	61,59 $\pm$ 8,34 <sup>a</sup>	4,07 $\pm$ 3,59 <sup>a</sup>	1,55 $\pm$ 0,95 <sup>b</sup>
CC 100	20,85 $\pm$ 5,41 <sup>a</sup>	13,52 $\pm$ 7,84 <sup>a</sup>	61,31 $\pm$ 5,84 <sup>a</sup>	1,94 $\pm$ 1,59 <sup>b</sup>	2,37 $\pm$ 1,28 <sup>a,b</sup>
CC 200	17,28 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>	19,95 $\pm$ 7,21 <sup>a</sup>	58,72 $\pm$ 6,84 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,89 <sup>b</sup>	3,16 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (p<0,05). (n=10)

Tabela 2

Volume dos elementos do intertúbulo (ml) por testículo de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

<b>Tratamentos</b>	<b>Células de Leydig</b>	<b>Vasos sanguíneos</b>	<b>Espaço linfático</b>	<b>Tecido conjuntivo</b>	<b>Macrófagos</b>
Controle	0,042 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>	0,034 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup>	0,141 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>	0,009 $\pm$ 0,009 <sup>b</sup>	0,004 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>
CC 100	0,056 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>	0,037 $\pm$ 0,022 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,042 <sup>a</sup>	0,005 $\pm$ 0,005 <sup>a,b</sup>	0,006 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>
CC 200	0,039 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,045 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>	0,139 $\pm$ 0,053 <sup>a</sup>	0,002 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,007 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (p<0,05). (n=10)

Tabela 3

Diâmetro nuclear e proporção entre núcleo e citoplasma de células de Leydig em testículos de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

<b>Tratamentos</b>	<b>Diâmetro nuclear (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Núcleo de Leydig (%)</b>	<b>Citoplasma Leydig (%)</b>
Controle	6,95 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	26,04 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	73,96 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
CC 100	6,87 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	25,7 $\pm$ 1,72 <sup>b</sup>	74,3 $\pm$ 1,72 <sup>b</sup>
CC 200	6,63 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	28,54 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	71,46 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). (n=10)

Tabela 4

Volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) em testículos de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

<b>Tratamentos</b>	<b>Volume nuclear</b>	<b>Volume citoplasmático</b>	<b>Volume de uma célula de Leydig</b>
Controle	177,3 $\pm$ 28,81 <sup>a</sup>	504,03 $\pm$ 79,67 <sup>b</sup>	681,33 $\pm$ 104,81 <sup>a</sup>
CC 100	172,27 $\pm$ 39,37 <sup>a</sup>	500,26 $\pm$ 128,77 <sup>b</sup>	672,53 $\pm$ 166,24 <sup>a</sup>
CC 200	155,29 $\pm$ 38,55 <sup>a</sup>	391,98 $\pm$ 105,89 <sup>a</sup>	547,28 $\pm$ 142,39 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). (n=10)

Tabela 5

Número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, índice Leydigossomático (ILS), peso da glândula vesicular (PGV) e peso dos epidídimos (PE) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Tratamentos	Número de células por testículo ( $\times 10^6$ )	Número de células por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	ILS (%)	PGV (g)	PE (g)
Controle	61,94 $\pm$ 16,34 <sup>a</sup>	40,56 $\pm$ 10,18 <sup>b</sup>	0,017 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	1,66 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	1,22 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
CC 100	85,41 $\pm$ 19,43 <sup>a</sup>	56,23 $\pm$ 14,02 <sup>a</sup>	0,023 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	1,63 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	1,23 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
CC 200	77,01 $\pm$ 32,51 <sup>a</sup>	46,72 $\pm$ 20,01 <sup>a,b</sup>	0,015 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	1,64 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	1,21 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). (n=10)

## CONCLUSÕES GERAIS

- O tratamento com infusão do caule de *Tynnanthus fasciculatus* (cipó-cravo), na dose de 200mg (CC200), aumentou significativamente o peso dos testículos e o peso do parênquima testicular.
- Houve aumento significativo no volume de túbulos seminíferos dos animais tratados com cipó-cravo na dose de 200mg em relação ao grupo controle, sugerindo aumento na produção espermática.
- O aumento do peso testicular e do volume total de túbulos seminíferos em animais tratados com cipó-cravo na dose de 200mg, em relação ao grupo controle, refletiu em aumento no comprimento total dos túbulos, o que pode levar ao aumento da produção espermática.
- Animais tratados com cipó-cravo na dose de 200mg apresentaram produção espermática diária (PED) total e por grama de testículo significativamente superiores aos demais grupos, indicando aumento na produção espermática.
- O índice tubulossomático do grupo tratado com cipó-cravo na dose de 200mg apresentou aumento significativo em relação ao grupo que recebeu 100mg (CC100), podendo estar relacionado à dose do extrato (dose-dependente).
- Houve redução da altura do epitélio seminífero no grupo CC200 em relação ao grupo CC100, o que pode estar associado ao aumento da dose, porém sem comprometimento do processo espermatogênico.
- O tratamento com infusão do caule de cipó-cravo na dose de 200mg elevou o número de células na fase de pré-leptóteno/leptóteno em relação ao grupo controle, o

que pode ser devido à redução de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa, refletindo em aumento significativo no número de espermátides arredondadas por testículo.

➤ A população de células de Sertoli manteve-se constante e os índices dessas células não mostraram diferença significativa entre os grupos experimentais, apesar dos melhores resultados serem observados em animais tratados com extrato aquoso de cipó-cravo na dose de 200mg.

➤ O tratamento com infusão do caule de cipó-cravo na dose de 200mg reduziu a proporção volumétrica e o volume de tecido conjuntivo e aumentou a população de macrófagos do intertúbulo em relação ao grupo controle.

➤ O tratamento com cipó-cravo na dose de 100mg proporcionou aumento significativo do volume das células de Leydig por testículo.

➤ O índice Leydigossomático aumentado em CC100 justifica-se pelo aumento significativo do número de células de Leydig por testículo ( $p=0,05$ ) e por grama de testículo ( $p<0,05$ ).

➤ Células de Leydig apresentaram aumento do núcleo e redução do citoplasma em animais tratados com cipó-cravo na maior dose (CC200).

➤ Os volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig apresentaram redução, apesar de somente o volume citoplasmático ser estatisticamente significativo em animais tratados com a dose de 200mg.

➤ O tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* aparentemente não alterou os níveis plasmáticos de testosterona, o que pode ser comprovado pelos pesos da

glândula vesicular e epidídimo (andrógeno-dependentes) que não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

- O tratamento com infusão do caule de *T. fasciculatus* na dose de 200mg produziu efeitos positivos sobre o compartimento tubular dos testículos de ratos Wistar adultos, porém pareceu exercer efeito tóxico para a linhagem das células de Leydig.
- Não foram observados elementos morfológicos que demonstrassem alterações histopatológicas no parênquima testicular ou mesmo que pudesse comprometer o processo espermatogênico.
- Este trabalho confirma sucesso da estratégia etnobotânica na comprovação do uso popular do cipó-cravo *Tynnanthus fasciculatus*.