

JANAINA DA SILVA

**HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR EM CAMUNDONGOS
EXPOSTOS À FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOIDES E
AO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Davilla elliptica* St.-Hil.
(DILLENIACEAE)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

S586h
2017
Silva, Janaina, 1994-
Histomorfometria testicular em camundongos expostos à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae) / Janaina Silva. – Viçosa, MG, 2017.
viii, 85f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sergio Luis Pinto da Matta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais - Indústria. 2. Matéria médica vegetal.
3. Flavonóides. 4. Reprodução. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

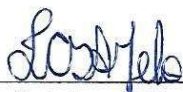
CDD 22 ed. 615.321

JANAINA DA SILVA

**HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR EM CAMUNDONGOS
EXPOSTOS À FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOÍDES E AO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Davilla elliptica* St.-Hil.
(DILLENIACEAE)**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2017.



Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo



João Bosco Gonçalves de Barros



Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

***Dedico às mulheres que eu amo além da vida:
Minha mãe, Nilza,
Minha irmã, Jaqueline
e à minha querida sobrinha, Sofia.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu viva em meio a pessoas que eu tanto amo, o que me dá forças para cada passo.

A minha mãe, que acredita em mim, pelo exemplo, carinho, apoio e todo o amor. Essa conquista é nossa!

A minha irmã, por quem tenho muito carinho e admiração, por ter estado comigo em todos os momentos e pela nossa eterna união.

A Sofia, minha doce princesinha, por ser quem alegra e motiva minha vida.

Ao Hugo, por me fazer sentir e viver todos os momentos, por me socorrer no desespero e me fazer companhia nessa caminhada.

A minha preciosa família. Em especial, ao Wesley e Osmar, as minhas tias Cacilda, Maria Cícera e Neuza e ao meu tio João Paulo, aos meus padrinhos Débora e Fernando, e meus queridos primos: Júlia, Matheus, Letícia, Luan, Priscila e Willyam. Vocês fizeram parte dessa caminhada e fazem parte da minha vida.

Ao meu orientador prof. Sérgio da Matta pela confiança demonstrada, pelos ensinamentos que vão além dos acadêmicos e pela valiosa orientação. Obrigada por me aceitar com vocês, eu sou muito feliz com a histologia.

A prof.^a Luzia Francisca de Souza, da Universidade Federal de Goiás – Campus Jataí-Go, pela concessão da planta.

A prof.^a Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo pelo auxílio e dedicação com esse trabalho desde o início e pela participação na banca avaliadora.

Ao prof. João Bosco Gonçalves de Barros pela participação na banca avaliadora.

Ao prof. João Paulo Viana Leite pela ajuda na execução do projeto, e pelo ensinamento ao longo desse tempo, juntamente agradecer a equipe do laboratório de Biodiversidade, em especial, Alisson, Laís e Letícia.

A prof.^a Jaqueline Carlos, por me apresentar o prof. Sérgio e por ser meu exemplo de professora desde o ensino médio.

As meninas da república Aconchego e ao Well. Vocês me ajudaram nos dias mais difíceis dessa caminhada, os primeiros.

A Fernanda, pela amizade e pelo aprendizado desde o primeiro dia que a vi. A Ana Luiza, Eduardo, Felipe, Graziela, Lidiane, Luiz, Susana, Talita, Tatiana, Veronica e Viviane, por fazerem a rotina do laboratório agradável, por tornar o laboratório tão acolhedor e pelo conhecimento que cada um compartilhou comigo ao longo desse tempo.

A Jerusa, pela ajuda e conhecimento ao longo da execução desse projeto.

A Elizabeth, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural.

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

A todos que participaram dos dias cansativos da eutanásia.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Plantas medicinais	4
3.2 Metabólitos secundários.....	4
3.3 <i>Davilla elliptica</i> St.-Hil.....	6
3.4 Testículo.....	7
3.5 Espermatogênese	8
3.6 Células de Sertoli	11
3.7 Células de Leydig.....	12
3.8 Estresse oxidativo	13
3.9 Referências	16
CAPÍTULO 1- Histomorfometria do compartimento tubular e estresse oxidativo dos testículos de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico da folha de <i>Davilla elliptica</i> St.-Hil. (Dilleniaceae)	25
RESUMO	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Obtenção dos extratos vegetais.....	27
2.2 Prospecção fitoquímica.....	28
2.3 Tratamento.....	29
2.4 Coleta de amostras e biometrias corporal e testicular.....	30
2.5 Microscopia de luz.....	31
2.6 Análise histopatológica qualitativa.....	31
2.7 Análise morfométrica e estereológica	31
2.8 Estresse oxidativo	35
2.9 Motilidade espermática	37
2.10 Análises estatísticas.....	37
3. RESULTADOS.....	37
3.1 Prospecção fitoquímica.....	37

3.2 Biometria corporal e testicular	38
3.3 Histopatologia qualitativa	39
3.4 Morfometria e estereologia.....	42
3.5 Estresse oxidativo	48
3.6 Motilidade espermática	50
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 2- Histomorfometria do compartimento intertubular de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico da folha de <i>Davilla elliptica</i> St.-Hil. (Dilleniaceae)	65
RESUMO	65
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Obtenção dos extratos vegetais.....	67
2.2 Tratamento.....	68
2.3 Coleta de amostras e biometrias corporal e testicular.....	69
2.4 Microscopia de luz.....	69
2.5 Análise morfométrica e estereológica do intertúbulo.....	69
2.6 Análises estatísticas.....	71
3. RESULTADOS	71
3.1 Biometria corporal e testicular	71
3.2 Morfometria e estereologia do intertúbulo	73
4. DISCUSSÃO	79
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS.....	81
CONCLUSÕES GERAIS	85

RESUMO

SILVA, Janaina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Histomorfometria testicular em camundongos expostos à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico de *Davilla elliptica* St.-Hil (Dilleniaceae).** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Davilla elliptica St.-Hil., conhecida como “lixinha” e “seca-testículo”, é utilizada para tratamento de inúmeras doenças, no entanto, é desconhecido seu efeito nos testículos. Objetivou-se avaliar os efeitos da fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e do extrato hidroalcoólico (EHADE) de *D. elliptica* nos testículos de camundongos Swiss adultos. 48 camundongos foram distribuídos em 7 grupos experimentais: G1- água destilada; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Foram realizadas prospecção fitoquímica, morfometria e estereologia do parênquima testicular, atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST), concentração de malondialdeído (MDA) e de óxido nítrico (ON) nos testículos e avaliação da motilidade espermática. Taninos, saponinas e óleos essenciais continham em ambos os extratos, e flavonoides na FEFDE. Houve diminuição do comprimento total de túbulos, volume de túbulo e de epitélio, onde a FEFDE demonstrou ação mais agressiva sendo capaz de alterar esses parâmetros nas duas maiores concentrações enquanto o EHADE somente na maior concentração. Os extratos não alteraram a atividade da CAT e concentrações de MDA e ON. SOD teve sua atividade aumentada em G4 e GST reduzida em todos os tratamentos, o que sugere influência mais efetiva do FEFDE a favor do estresse oxidativo. O intertúbulo não sofreu alterações em seus componentes, exceto G2 que teve aumento de tecido conjuntivo e G4 que apresentou aumento do núcleo de Leydig, ambas as alterações provocadas pela FEFDE. O EHADE, nas doses administradas, não causou alterações no intertúbulo. Embora a produção espermática não foi influenciada, a funcionalidade dos espermatozoides foi afetada como visto a diminuição da motilidade espermática. Pode-se concluir que EHADE e, principalmente FEFDE têm efeitos negativos para a espermatogênese.

ABSTRACT

SILVA, Janaina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Testicular histomorphometry in mice exposed to flavonoid enriched fraction and to the hydroalcoholic extract of *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae).** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Davilla elliptica St.-Hil., known as "lixinha" and "seca-testículo", is used to treat numerous diseases. However, its effect on the testicles is unknown. The aim of this study was to evaluate the effects of the flavonoid enriched fraction (FEFDE) and the hydroalcoholic extract (EHADE) of *D. elliptica* on the testis of Swiss adult mice. 48 mice were distributed in 7 experimental groups: G1- distilled water; G2- FEFDE 100 mg/kg; G3- FEFDE 200 mg/kg; G4- FEFDE 400 mg/kg; G5- EHADE 100 mg/kg; G6- EHADE 200 mg/kg; G7- EHADE 400 mg/kg. There were performed phytochemical prospecting, morphometry and stereology of the testicular parenchyma, catalase enzyme (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) activities, malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) concentrations in the testicles and evaluation of sperm motility. Tannins, saponins and essential oils contained in both extracts, and flavonoids in the FEFDE. There was a decrease in the total tubule length and volume of the tubule and epithelium, where FEFDE showed the most aggressive action being able to change the two largest concentrations while the EHADE only in the highest concentration. Sperm motility was reduced in all treated groups. The extracts did not alter the CAT activity and concentrations of MDA and NO. SOD had its activity increased in G4 and GST reduced in all treatments, suggesting a more effective influence of FEFDE in favour of oxidative stress. The intertubular space did not change its components, except G2 that had an increase of the connective tissue and G4 that presented incensement of the Leydig nucleus, both provoked by the FEFDE. EHADE, at the administered doses, did not cause any change interstitial space. Although sperm production was not influenced, sperm function was affected as the decrease in sperm motility. It can be concluded that EHADE and especially FEFDE have negative effects on spermatogenesis.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Há tempos, a utilização de plantas medicinais tem sido um recurso crescente pela população mundial devido à inacessibilidade a medicamentos (MONTEIRO et al., 2012), efeitos colaterais e alto custo dos medicamentos existentes, perspectiva de uso prolongado (GONÇALVES et al., 2006; LAURINAVICIUS e SANTOS 2008) e ainda aparecimento de novas doenças (CAPASSO et al., 2000). Os efeitos ditos medicinais dessas plantas são atribuídos aos metabólitos secundários, principalmente a uma importante classe de polifenóis, os flavonoides. Presentes em grande quantidade na dieta humana, são descritos como antioxidantes, os quais podem ajudar a neutralizar os danos celulares e teciduais (CUEVA et al., 2017). Por outro lado, grande parte das infusões e extratos fitoterápicos ainda não tiveram seus efeitos sobre diferentes órgãos descritos e comprovados (MONTEIRO et al., 2009; PREDES et al., 2009; MELO et al., 2010; ATSAFACK et al., 2015).

A espécie *Davilla elliptica* St.-Hil., conhecida como “lixinha” e ainda “seca-testículo” é endêmica do Cerrado, pertence à família Dilleniaceae, sendo empregada pela medicina tradicional com diferentes indicações. Levantamento etnobotânico cita seu uso como adstringente, tônica, laxativa, sedativa, diurética (RODRIGUES e CARVALHO, 2001), para tratamento de hemorroidas, diarreias, ferimentos (SOARES et al., 2005), úlceras gástricas (RODRIGUES et al., 2008) e ainda para orquites (BISO et al., 2010). Possui ainda efeito antinociceptivo (AZEVEDO et al., 2007) e antiofídico (NISHIJIMA et al., 2009), sendo capaz de atenuar edemas (NISHIJIMA et al., 2015). A maioria dos efeitos citados são atribuídos à presença de flavonoides. Tem-se conhecimento que *D. elliptica* é amplamente utilizada pela população para o controle de enfermidades, mas a literatura apresenta-se escassa quanto aos efeitos dessa planta no organismo, principalmente nos testículos.

Os testículos são órgãos complexos e exercem função exócrina e endócrina. São responsáveis pela produção de espermatozoides e andrógenos, os quais mantêm a função reprodutiva e as características sexuais secundárias. O testículo pode ser dividido morfofisiologicamente em dois compartimentos, tubular e intertubular. O compartimento tubular é composto pelas células

germinativas e as células de Sertoli, sendo responsável pela função exócrina. O compartimento intertubular é composto por vasos sanguíneos, espaços linfáticos, células do tecido conjuntivo, nervos e células de Leydig, sendo estas responsáveis pela função endócrina testicular (RUSSELL e FRANÇA, 1995; KARL e CAPEL, 1998; HERMO et al., 2010).

Alterações em qualquer componente testicular podem interferir na função gonadal (SHARPE et al., 1990). A histomorfometria permite a identificação de tais alterações a nível celular e tecidual e, a avaliação das respostas antioxidantes permite compreender os transtornos moleculares e metabólicos, para melhor entendimento da ação do extrato ofertado.

O presente trabalho aborda aspectos da reprodução animal, com enfoque na histomorfometria testicular e respostas antioxidantes dos testículos de camundongos Swiss adultos, sob influência da fração enriquecida em flavonoides e do extrato hidroalcoólico de *Davilla elliptica*. Frente ao uso desconhecido e descontrolado de tal planta, tida como medicinal, fez-se necessário este estudo sobre seus efeitos nos testículos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a Histomorfometria testicular de camundongos Swiss adultos após exposição crônica a doses crescentes da fração enriquecida em flavonoides e do extrato hidroalcoólico da folha de *Davilla elliptica* St.-Hil.

2.2 Específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica da fração enriquecida em flavonoides e do extrato hidroalcoólico da folha de *D. elliptica*;
- Obter valores biométricos corporal e testicular;
- Determinar a proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e intertubulares;
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES) e Leydigossomático (ILS);
- Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos e o comprimento total de túbulo por grama de testículo;
- Obter a contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero e razões entre os números celulares;
- Determinar a produção espermática diária total por testículo e por grama de testículo;
- Calcular o número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo, bem como a capacidade total de suporte dessas células;
- Obter o rendimento geral da espermatogênese;
- Mensurar o diâmetro, volume nuclear e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST);
- Mensurar a concentração de óxido nítrico (ON) e de malondialdeído (MDA) nos testículos;
- Avaliar a motilidade espermática.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

O homem sempre buscou no reino vegetal recursos para a sua sobrevivência, seja para a alimentação, com aprendizado de práticas agrícolas, ou para a cura de enfermidades, por meio do uso de plantas medicinais (LEITE, 2009). Há tempos produtos naturais de origem animal ou vegetal, são empregados na medicina popular com a finalidade de prevenir ou tratar doenças, embora a eficácia de muitos ainda não tenha sido comprovada (MORAIS et al., 2012). A utilização de plantas medicinais pela população mundial tem-se tornado um recurso crescente sendo, porém, necessários mais estudos para avaliar seus efeitos adversos ou tóxicos (CASTRO et al., 2005).

Segundo Monteiro et al. (2012), grande parte da população mundial não tem acesso a tratamentos médicos ou a drogas sintéticas recorrendo ao uso da medicina tradicional. Por outro lado, Capasso et al. (2000) relacionam o aumento na venda de medicamentos à base de plantas com o aparecimento de novas doenças para as quais ainda não existe tratamento apropriado, além da convicção dos usuários de que, por ser um medicamento natural, não trazem malefícios ao organismo. Adicionalmente, as pessoas subestimam a toxicidade de produtos naturais, além do fato que infusões e extratos fitoterápicos comercializados em mercados locais não têm controle de qualidade e podem ser prejudiciais.

3.2 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são biossintetizados a partir de metabólitos primários como lipídios, carboidratos e aminoácidos, por intermédio de reações enzimáticas ocorridas no interior da célula vegetal (LEITE, 2009). Exemplos de metabólitos secundários são os taninos, saponinas, óleos essenciais e flavonoides (SIMÕES et al., 2007).

Fitoterápicos contendo taninos são indicados devido a sua propriedade adstringente e antidiarreica, mas devido à habilidade dos taninos de ligarem-se às proteínas, eles podem ser ao mesmo tempo tóxicos (MONTEIRO et al., 2005). As saponinas conseguem influenciar na permeabilidade da membrana e até mesmo provocar lise, pois interagem com os lipídios de membranas, principalmente o colesterol. São atribuídas a elas atividade hemolítica, antibacteriana e ainda citotóxica (ARABSKI et al., 2012; CARVALHO et al., 2012). Tem sido atribuído aos óleos essenciais de algumas plantas efeito antimicrobiano (CUSTÓDIO et al., 2010; MIRANDA et al., 2016). A literatura traz ainda alguns dados toxicológicos e efeitos adversos desse composto, como neurotóxico e excitatório, relacionados principalmente à ingestão oral (SIMÕES et al., 2007).

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis e estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (SIMÕES et al., 2007). Os benefícios dos polifenóis, em geral, têm sido atribuídos à sua atividade de eliminação das espécies oxidantes, que pode ajudar a neutralizar os danos celulares e teciduais (YAO et al., 2004; CUEVA et al., 2017). Somando aos benefícios, Machado et al. (2008) apontam atividade anti-inflamatória e inibição do ciclo celular, em linhagem de células cancerosas, atribuídas aos flavonoides.

Pouco se tem pesquisado acerca dos efeitos dos flavonoides sobre o sistema reprodutor. O efeito da quercetina, o flavonoide mais abundante na dieta humana (YAO et al., 2004), tem sido descrito em alguns estudos. Bharti et al. (2014) observaram que a quercetina reduziu danos induzidos pelo excesso de estrógeno em testículos, estimulou a produção de andrógeno, e impediu a apoptose de células germinativas, o que levou à restauração da função testicular. A quercetina promoveu ainda efeito protetor contra toxicidade testicular causada pelo cádmio, com diminuição da taxa de apoptose (BU et al., 2011), e a toxicidade testicular causada por partículas de diesel (IZAWA et al., 2008).

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonoides é vasto, mas até o momento não há comprovação evidente de que esses metabólitos

sejam imprescindíveis (SIMÕES et al., 2007). Dentre os compostos secundários atualmente estudados, os flavonoides têm merecido destaque decorrente das suas ações terapêuticas demonstradas (MACHADO et al., 2008).

3.3 *Davilla elliptica* St.-Hil.

O gênero *Davilla* é pertencente à família Dilleniaceae e compreende cerca de 20 espécies (GURNI e KUBITZKI, 1981). *Davilla elliptica* é endêmica do bioma Cerrado, tem porte arbustivo que atinge 1,5m de altura, sendo ramificada. As flores são de cor amarela e os frutos, quando secos, são redondos de cor marrom-amarelada. Suas folhas são inteiras, alternas, elípticas, pecioladas e possuem tricomas (SOARES et al., 2005; KORNDORFER, 2006). Devido a essa última característica das folhas, elas apresentam aspereza ao tato, o que leva essa espécie ser popularmente conhecida como “lixinha” (BISO et al., 2010). Também é comumente conhecida como “seca-testículo” (comunicação pessoal).

A maioria das espécies desse gênero é empregada na medicina tradicional com diferentes indicações. Rodrigues et al. (2008) relatam o uso popular de *D. elliptica* para o tratamento de úlceras gástricas enquanto Soares et al. (2005) apontam o uso para tratamentos de hemorroidas, diarreias e ferimentos. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado encontraram as seguintes indicações para o uso de *D. elliptica*: adstringente, tônica, laxativa, sedativa, diurética (RODRIGUES e CARVALHO, 2001), e ainda para o tratamento de orquites (BISO et al., 2010).

Lopes et al. (2007) avaliaram a atividade imunológica do extrato clorofórmico de *D. elliptica* em culturas de macrófagos peritoneais, assim como sua atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*. Neste trabalho, o extrato de clorofórmio de *D. elliptica* apresentou resultados promissores sinalizando que essa planta pode ter potencial terapêutico imunológico e microbiológico da tuberculose. Em outro estudo foi revelado o efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico de *D. elliptica* em ratos (AZEVEDO et al., 2007) sendo atribuído esse efeito ao flavonoide miricetina 3-O-β-galactosídeo (AZEVEDO et al., 2015). Foi demonstrado também o efeito antiofídico do extrato

metanólico das folhas de *D. elliptica*, o qual revelou capacidade de neutralização total contra hemorragias locais. A fração de flavonoides das folhas de *D. elliptica*, que continha derivados de quercetina e miricetina, também apresentou os mesmos resultados (NISHIJIMA et al., 2009). Adicionalmente, Nishijima et al. (2015) observaram que extrato metanólico e fração enriquecida em taninos foram capazes de atenuar o edema induzido nas patas de ratos Wistar, bem como atuaram como anti-inflamatório, embora não tenham sido identificadas essas mesmas ações para a fração rica em flavonoides.

D. elliptica é amplamente utilizada pela população para o controle de várias enfermidades. Entretanto, a literatura apresenta-se escassa quanto aos efeitos dessa planta, dita como medicinal, no organismo e, principalmente nos testículos.

3.4 Testículo

Os testículos se encontram geralmente fora da cavidade abdominal, no escroto, permitindo que a temperatura testicular fique cerca de dois graus abaixo da temperatura corporal, o que é crucial para o desenvolvimento ótimo da espermatogênese (BERNE e LEVY, 2009). São órgãos complexos com função exócrina e endócrina. São responsáveis pela produção de espermatozoides e andrógenos, os quais mantêm a função reprodutiva e as características sexuais secundárias (RUSSELL e FRANÇA, 1995; HERMO et al., 2010). O parênquima testicular é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso denominada albugínea. Esta é espessada na superfície dorsal dos testículos para formar o mediastino, onde está localizada a rede testicular. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Nos mamíferos, o testículo é dividido em dois compartimentos: o intertubular ou intersticial e o tubular, constituído por túbulos seminíferos (RUSSELL et al., 1990). Os túbulos seminíferos são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular, local onde se encontram os espermatozoides e o fluido secretado pelas células de Sertoli. O epitélio seminífero é formado por duas populações celulares distintas: as células

germinativas e as células de Sertoli (célula somática) (KARL e CAPEL, 1998). O túbulo seminífero é envolvido por uma lâmina basal e uma bainha de tecido conjuntivo, constituindo a túnica própria, que contém em sua camada mais interna as células mioides (HERMO et al., 2010). Os túbulos seminíferos se alojam como novelos envolvidos por um tecido conjuntivo frouxo, o intertúbulo, composto por vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, células do tecido conjuntivo como fibroblastos e macrófagos e células de Leydig. Os túbulos seminíferos são responsáveis pela função exócrina, ou seja, produção de espermatozoides, enquanto as células de Leydig secretam andrógeno testicular (NAVARRO et al., 2004).

Alterações numéricas, morfológicas ou morfométricas em qualquer componente testicular, seja no epitélio seminífero ou no tecido intertubular, ou ainda alterações na vascularização, podem estar correlacionadas com alterações na função testicular (SHARPE et al., 1990).

3.5 Espermatogênese

A fertilidade masculina requer a produção de grande número de espermatozoides normais através de um processo complexo conhecido como espermatogênese (DE KRETZER et al., 1998). Este é um processo pelo qual as células germinativas se desenvolvem e diferenciam em espermatozoides, sempre associados às células de Sertoli. A espermatogênese inclui divisão celular por mitose e meiose, e citodiferenciação final das células germinativas em espermatozoides, processo este chamado de espermiogênese (HERMO et al., 2010).

A espermatogênese pode ser dividida em três etapas principais: I- fase proliferativa, na qual há multiplicação de espermatogônias por mitose; II- fase meiótica, onde o material genético é recombinado e segregado, e começa com a entrada de espermatogônias do tipo B na fase de preleptóteno dando início à prófase da primeira divisão meiótica. Estas células neoformadas são chamadas de espermatócitos primários, que se dividem e dão origem aos espermatócitos secundários que se dividem e originam as espermátides

arredondadas; III- fase denominada de espermiogênese, na qual ocorre a citodiferenciação das espermatídes arredondadas em espermatozoides (RUSSELL et al., 1990; DE KRETZER et al., 1998;).

As células de Sertoli e as células germinativas estão intimamente associadas no epitélio seminífero, onde as células germinativas são organizadas de forma bem definida em camadas concêntricas. Na camada basal do epitélio seminífero encontram-se as espermatogônias e os espermatócitos primários em preleptóteno, enquanto que nas camadas seguintes observam-se os espermatócitos primários, secundários e espermatídes (RUSSELL et al., 1990).

As células de Sertoli criam um ambiente altamente especializado onde é possível a ocorrência da espermatogênese (DE KRETZER et al., 1998). Tem-se o início da espermatogênese com a espermatogônia do tipo A e, a partir dela, as espermatogônias iniciam um processo contínuo de divisões mitóticas e produzem sucessivas gerações. As células neoformadas podem continuar a se dividir e originar novas espermatogônias, mantendo-se como células-tronco, ou diferenciar-se em espermatogônias B que passam por alguns ciclos mitóticos e originam os espermatócitos I, células que entram em meiose. Estes e as futuras células resultantes mantêm-se unidos por pontes citoplasmáticas até o final da espermatogênese. Phillips et al. (2010) afirmam que o desenvolvimento do processo espermatogênico sincronizado é facilitado por essa citocinese incompleta, pela qual são trocadas proteínas e RNAm que auxiliam na coordenação do desenvolvimento sincronizado. Como a prófase da primeira divisão meiótica é muito demorada, a maioria dos espermatócitos I vistos nas preparações histológicas está nessa fase. Os espermatócitos I são as maiores células da linhagem espermatogênica e são caracterizados pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Dessa primeira divisão meiótica resultam células menores, os espermatócitos II de difícil observação nos cortes histológicos, pois entram logo na segunda divisão meiótica. Desta segunda divisão resultam as espermatídes arredondadas, caracterizadas pelo pequeno tamanho, núcleos com zona de cromatina condensada e por sua localização próxima à luz dos túbulos seminíferos. Nesta fase terminam as divisões celulares e as espermatídes passam para a fase final da produção de

espermatozoides, a espermiogênese, onde ocorre a formação do acrossomo, condensação e alongamento do núcleo, desenvolvimento do flagelo e perda de grande parte do citoplasma. Ao final, os espermatozoides são liberados no lúmen do túbulo seminífero. (DE KRETZER et al., 1998; HERMO et al., 2010).

A espermatogênese é um processo complexo, mas altamente preciso e ocorre de forma ordenada composta de processos cíclicos repetitivos. Pode ser subdividida em estádios, que juntos formam o ciclo do epitélio seminífero (LEBLOND e CLEMONT, 1952; SHARPE et al., 1990; PHILLIPS et al., 2010). Os estádios podem ser classificados por dois métodos: o da morfologia tubular, o qual toma como base a morfologia e a posição das células germinativas, sendo descritos oito estádios para a maioria das espécies (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; ROOSEN-RUNGE, 1955; BERNDTSON, 1977); e o método do sistema acrossômico, onde o número de estádios varia de acordo com a espécie (LEBLOND e CLEMONT, 1952).

A hipófise secreta dois hormônios gonadotróficos: o FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). Estes regulam as funções das células de Sertoli e das células de Leydig, respectivamente, sendo, portanto, reguladores obrigatórios da espermatogênese. O LH estimula a síntese de testosterona pelas células de Leydig, enquanto a síntese de ABP (proteína ligante de andrógeno) pelas células de Sertoli é estimulada pelo FSH. A ABP liga-se a andrógenos (testosterona e di-hidrotestosterona), e este complexo mantém altos níveis de andrógenos nas proximidades das células espermatogênicas, sendo de extrema importância para o processo espermatogênico. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), produzido no hipotálamo, estimula a secreção de LH e FSH. O FSH estimula as células de Sertoli a liberar um hormônio peptídeo chamado inibina que, especificamente, retroalimenta negativamente a secreção de FSH. A testosterona por sua vez atua na hipófise diminuindo a síntese de LH, ou até mesmo diminui a síntese de GnRH, através de *feedback* negativo (O'DONNELL et al., 2001; KIERSZENBAUM, 2008; SALTZMAN et al., 2010).

3.6 Células de Sertoli

As células de Sertoli aparecem no início do desenvolvimento embrionário e se proliferam até as primeiras semanas depois do nascimento. Após a proliferação, as células de Sertoli se diferenciam e mantêm seu número estável ao longo da vida adulta. A proliferação e maturação das células de Sertoli são essenciais para o pleno potencial espermatogênico no adulto (O'DONNELL et al., 2001).

As células de Sertoli influenciam tanto a formação dos testículos no embrião, quanto a espermatogênese no adulto, regulando o ambiente das células germinativas. Na formação inicial dos testículos, as células de Sertoli sequestram as células germinativas (gonócitos) dentro dos túbulos seminíferos formados recentemente. Na espermatogênese, as células de Sertoli fornecem fatores críticos e necessários para a ocorrência desse processo como suporte físico e nutricional (GRISWOLD, 1998).

A célula de Sertoli estende-se desde a base até o lúmen dos túbulos seminíferos (OLIVEIRA e ALVES, 2015). O núcleo da célula de Sertoli é uma das suas organelas mais distinguíveis, pois é grande e capaz de mudar de forma através do ciclo do epitélio seminífero, geralmente exibindo profundas invaginações da membrana nuclear (FRANÇA et al., 2016).

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

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

3.7 Células de Leydig

Células de Leydig ou células intersticiais aparecem primeiramente no testículo no início do desenvolvimento embrionário. Essas células secretam altas concentrações de andrógeno que são requeridas para a masculinização fetal, e persistem durante toda vida adulta. As células de Leydig fetais não são progenitoras das células de Leydig no adulto. Antes da puberdade, há um rápido crescimento das células de Leydig precursoras mesenquimais, e assim, as células de Leydig dividem-se para produzir a população de células adultas responsável pela produção de testosterona e manutenção da função reprodutiva masculina (LEJEUNE et al., 1998; O'DONNELL et al., 2001; NAVARRO et al., 2004).

As células de Leydig estão presentes no compartimento intertubular em proximidades a vasos sanguíneos e linfáticos. São produtoras de

esteroides e, portanto, contêm gotículas lipídicas em seus citoplasmas. Essas células sintetizam a testosterona, hormônio essencial para a espermatogênese normal, fertilidade e também responsável pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas secundárias. Presume-se que a testosterona atue sobre as células de Sertoli (e também sobre as células peritubulares) para estimular a produção de fatores necessários para a espermatogênese (SHARPE et al., 1990; KIERSZENBAUM, 2008).

Em adição, Sharpe et al. (1990) reconhecem que as células de Leydig são fontes de vários outros hormônios, não se limitando somente à produção de testosterona, mas de outros esteroides que atuam na fisiologia do testículo.

A função esteroidogênica e a estrutura da célula de Leydig apresentam correlação direta com o volume ocupado pelo retículo endoplasmático liso e com o número de células de Leydig por testículo (CASTRO et al., 2002; NAVARRO et al., 2004).

3.8 Estresse oxidativo

O desequilíbrio entre os mecanismos oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, potencialmente causador de danos, é denominado de estresse oxidativo (SIES et al., 1997).

O funcionamento celular normal é dependente de reações de oxidorredução e como esse processo é feito geralmente em etapas, surge a oportunidade da formação de compostos intermediários com elétrons desemparelhados denominados de radicais livres. Radicais livres são moléculas que apresentam um elétron não emparelhado no orbital externo, o que as tornam muito reativas a qualquer outro tipo de molécula como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são resultantes do oxigênio molecular (O_2) sendo o O_2 a principal fonte de radicais livres da célula (RIBEIRO et al., 2005; BRASILEIRO FILHO, 2011).

Todas as células em organismos eucarióticos contêm poderosas enzimas antioxidantes (SIES, et al., 1997). Por meio da ação das enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), o organismo mantém a concentração de EROs dentro dos limites fisiológicos, o que forma o mecanismo antioxidante enzimático (RIBEIRO et al., 2005). A SOD converte enzimaticamente o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DROGE, 2002) enquanto a CAT é responsável pela decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 (AEBI, 1984). A GST é responsável pela desintoxicação celular contra substratos exógenos como medicamentos. Essa desintoxicação ocorre através de conjugados de glutathione com xenobióticos e produtos aldeídos produzidos na peroxidação lipídica, tornando os produtos mais solúveis em água (HABIG et al., 1974; HERMES-LIMA, 2004).

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

O óxido nítrico (ON) é uma molécula pequena com alta afinidade pelas hemoproteínas ferrosas, que está envolvido em importantes eventos fisiológicos. Sua relevância biológica na neurotransmissão, anti-inflamação e sua função como molécula reguladora no controle do relaxamento do músculo liso e na inibição da adesão plaquetária justifica sua mensuração em campos experimentais (RICART-JANÉ et al., 2002; DROGE, 2002). Ainda, o ON está relacionado ao controle da dinâmica dos complexos juncionais da barreira testicular (GILIO et al., 2008).

O malondialdeído (MDA) é um produto de oxidação lipídica sendo importante marcador de estresse oxidativo, determinado para quantificar a peroxidação lipídica em amostras (JANERO, 1990).

O estresse oxidativo é um fator chave envolvido na infertilidade masculina. As EROs podem ter efeito positivo ou negativo na viabilidade do

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

3.9 Referências

AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

ARABSKI M.; WEGIEREK-CIUK, A.; CZERWONKA, G.; LANKOFF, A.; KACA, W. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 1-6, 2012.

ATSAFACK, S. S.; KUIATE, J. R.; MOUOKEU, R. S.; MOGTOMO, L. K.; TCHINDA, A. T.; DE DIEU, T. J.; NANA, H. M.; ETAME, R. M. E.; BIYITI, L.; NGANE, A. N. Toxicological studies of stem bark extract from *Schefflera barteri* Harms (Araliaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, p. 2-9, 2015.

AZEVEDO, A. O.; CAMPOS, J. J.; GALDINO, G. S.; BRAGA, F. C.; DUARTE, I. D. G.; PEREZ, A. C. Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 354–356, 2007.

AZEVEDO, A. O.; CAMPOS, J. J.; SOUZA, G. G.; VELOSO, C. C.; DUARTE, I. D. G.; BRAGA, F. C.; PEREZ, A. C. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of myricetin 3-O- β -galactoside isolated from *Davilla elliptica*: involvement of the nitrenergic system. *Journal of Natural Medicines*, v. 69, p. 487–493, 2015.

BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, v. 44, n. 5, 1977.

BERNE & LEVY. *Fisiologia*. 6^o edição. Ed. Elsevier, 859p, 2009.

BHARTI, S.; MISRO, M. M.; RAI, U. Quercetin supplementation restores testicular function and augments germ cell survival in the estrogenized rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 383, p. 10–20, 2014.

BISO, F. I.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; REIS, M. B.; BERNARDI, C. C.; MATTO, J. C. P.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A.; VILEGAS, W.; CÓLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 702 p. 92-99, 2010.

BRASILEIRO FILHO, G. B. Bogliolo, Patologia. 8º edição. Ed. Guanabara Koogan, 1524p, 2011.

BU, T.; MI, Y.; SENG, W.; SHANG, C. Protective effect of quercetin on cadmium-induced oxidative toxicity on germ cells in male mice. The Anatomical Record, v. 294, p. 520–526, 2011.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. Fitoterapia, v. 71, p. 58-65, 2000.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A.; VALÉRIO, H. M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* FR. Allemão. Revista de Biologia e Farmácia, v. 8, n. 2, p. 97-103, 2012.

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

CASTRO, A. P.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. Acta Scientiae Veterinariae, v. 33, n. 3, p. 265-269, 2005.

CUEVA, C.; GIL-SÁNCHEZ, I.; AYUDA-DURÁN, B.; GONZÁLES-MANZANO, S.; GONZÁLES-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*, v. 22, p. 1-15, 2017.

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

DE KRETZER, D. M.; LOVELAND, K. L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N. Spermatogenesis. *Human reproduction*, v. 13, p. 1-8, 1998.

DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.

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

FRANÇA, L. R.; HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HOFMANN, M. C.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, v. 4, p. 189-212, 2016.

GILIO, J. M.; BORELLA, M. I.; CAMARGO, A. C. M.; SILVA, C. A. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. *ConScientiae Saúde*, v. 7, n. 1, p. 69-76, 2008.

GONÇALVES M. C. R.; DINIZ, M. F. F. M.; BORBA, J. D. C. B.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Berinjela (*Solanum melongena* L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 252-257, 2006.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 411-416, 1998.

GURNI, A. A.; KUBITZKI, K. Flavonoid chemistry and systematics of the dilleniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 9, n. 2/3 p. 109–114, 1981.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: WILEY & SONS, J.; HOBOKEN, N. J. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Ed. K. B. Storey, 640p, 2004.

HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; SMITH, C. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*, v. 73, p. 243-278, 2010.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Sertoli cell biology. Chapter 3: Structure of the Sertoli cell. Ed. Elsevier, p. 19-40, 2005.

IZAWA, H.; KOHARA, M.; AIZAWA, K.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; WATANABE, G.; TAYA, K.; SAGAI, M. Alleviative effects of quercetin and onion on male reproductive toxicity induced by diesel exhaust particles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 72, n. 5, p. 1235–1241, 2008.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Cap. 21 Aparelho reprodutor masculino. 12ª edição. Ed. Guanabara Koogan, p. 411-426, 2013.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cell of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, v. 203, p. 323-333, 1998.

KIERSZENBAUM, A. L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Cap. 20 Espermatogênese. 2ª edição. Ed. Elsevier, p. 573-595, 2008.

KORNDORFER, A. P. A importância do silício nas relações entre herbívoros e *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) St. Hill no cerrado. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2006.

LAURINAVICIUS, A. G.; SANTOS, R. D. Dislipidemia, estatinas e insuficiência renal crônica. *Revista Brasileira Hipertensão*, v. 15, n. 3, p. 156-161, 2008.

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

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

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

LOPES, F. C. M.; PLACERES, M. C. P.; JORDÃO JUNIOR, C. M.; HIGUCHI, C. T.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; LEITE, C. Q. F.; CARLOS, I. Z. Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n. 6, p. 769-772, 2007.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

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

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. Revista Ciência Agronômica, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MONTEIRO, J. C.; DA MATTA, S. L. P.; PREDES, F. S.; OLIVEIRA, T. T. Liver morphology and morphometry and plasma biochemical parameters of Wistar rats that received leaf infusion of *Rudgea viburnoides* Benth. (Rubiaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52, n. 2, p. 407-412, 2009.

MONTEIRO, J. C.; DA MATTA, S. L. P.; PREDES, F. S.; PAULA, T. A. R. Testicular morphology of adult Wistar rats treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. leaf infusion. Brazilian Archives of Biology Technology, v. 55, n. 1, p. 101-105, 2012.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. Química Nova, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAIS, D. B.; BARBOSA, L. P.; MELO, B. E. S.; MATTA, S. L. P.; NEVES, M. M.; BALARINI, M. K., RODRIGUES, M. V. Microscopia e morfometria de componentes tubulares de testículos de coelhos suplementados com geleia real. Arquivo Brasileiro de Medicina, Veterinária e Zootecnia, v. 64, n. 4, p. 810-816, 2012.

NAVARRO, R. D.; PAULA, T. A. R.; DA MATTA, S. L. P.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Efeito da exposição pré e pós-natal ao ultrassom de baixa densidade sobre a célula de Leydig e demais componentes do espaço intertubular do testículo de camundongos adultos. Revista Ceres, v. 51, n. 296, p. 445-455, 2004.

NISHIJIMA, C. M.; DELELLA, F. K.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; LOPES-FERREIRA, M. V. A. The Anti-Inflammatory Effects of the Methanolic Extract and Fractions from *Davilla elliptica* St. Hil. (Dilleniaceae) on *Bothrops jararaca* Envenomation. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, p. 12454-12466, 2015.

NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. Molecules, v. 14, p. 1072-1080, 2009.

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

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. Endocrine Review, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

PHILLIPS, B. T.; GASSEI, K.; ORWIG, K. E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Philosophical Transactions of the Royal Society, v. 365, p. 1663-1678, 2010.

PREDES, F. S.; DA MATTA, S. L. P.; MONTEIRO, J. C.; OLIVEIRA, T. T. Investigation of liver tissue and biochemical parameters of adult Wistar rats treated with *Arctium lappa* L. Brazilian Archives Biology Technology, v. 52, n. 2, p. 335-340, 2009.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. Bioscience Journal, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. Nitric Oxide: Biology and Chemistry, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

RODRIGUES, C. R.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. Phytochemical Analysis, v. 19, p. 17-24, 2008.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROOSEN-RUNGE E. C.; GIESEL L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. American Journal of Anatomy, v. 87, n. 1, p. 1-30, 1950.

ROOSEN-RUNGE E. C. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. Anatomical Record, v. 123, n. 4, p. 385-398, 1955.

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

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

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building the testis. *Tissue and Cell*, v. 27, n. 2, p. 129-147, 1995.

SALTZMAN, W.; TARDIF, S. D.; RUTHERFORD, J. N. Hormones and reproduction of vertebrates. Chapter 13: Hormones and reproductive cycles in primates. Ed. Elsevier, v. 5, p. 1-35, 2010.

SHARPE, R. M.; MADDOCKS, S.; KERR, J. B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *American Journal of Anatomy*, v. 188, p. 3-20, 1990.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. Ed. UFRGS, 6^o Edição. 1903p., 2007.

SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hill. (Dilleniaceae). *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 15, n. 4, p. 352-360, 2005.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 59, p. 113–122, 2004.

CAPÍTULO 1: Histomorfometria do compartimento tubular e estresse oxidativo dos testículos de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico da folha de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae)

RESUMO

Davilla elliptica St.-Hil (Dilleniaceae), conhecida como “seca-testículo”, é utilizada pela população para o controle de várias enfermidades, entretanto, é desconhecido seu efeito nos testículos. Teve-se como objetivo avaliar os efeitos da fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e do extrato hidroalcoólico (EHADE) de *D. elliptica* no compartimento tubular, no estresse oxidativo dos testículos e na motilidade espermática de camundongos Swiss adultos. 48 camundongos foram distribuídos em 7 grupos experimentais: G1- água destilada; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Foi realizada prospecção fitoquímica e avaliação dos parâmetros biométricos corporal e testicular, da morfometria e estereologia do compartimento tubular, da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST), da concentração de óxido nítrico (ON) e de malondialdeído (MDA) nos testículos e avaliação da motilidade espermática. A prospecção fitoquímica relevou a presença de taninos, saponinas e óleos essenciais em ambos os extratos, e de flavonoides na FEFDE. Houve diminuição do volume do parênquima, de túbulos seminíferos e de epitélio seminífero, e também redução do comprimento total de túbulos, onde a FEFDE demonstrou ação mais agressiva, pois foi capaz de alterar esses parâmetros nas duas maiores concentrações e o EHADE somente na maior concentração. Os extratos não alteraram CAT, MDA e ON. SOD teve sua atividade aumentada em G4 e GST reduzida em todos os tratamentos. Ambos os extratos causaram alterações histopatológicas nos túbulos seminíferos, e os resultados das enzimas antioxidantes sugerem influência mais efetiva do FEFDE a favor do estresse oxidativo. Embora a produção espermática não foi influenciada, a funcionalidade dos espermatozoides foi comprometida uma vez que houve redução da motilidade espermática.

1. INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais para a prevenção e/ou tratamento de várias doenças remonta ao início da civilização (SAHOO et al., 2010). Todavia, as plantas utilizadas na medicina popular devem ser avaliadas em termos de toxicidade e recomendações necessárias para o seu uso (ATSAFACK et al., 2015). Os flavonoides constituem uma importante classe dos polifenóis e têm sido descritos como antioxidantes, os quais auxiliam na neutralização de danos celulares e teciduais (CUEVA et al., 2017). Entretanto, pouco se tem pesquisado acerca do efeito dos flavonoides nos testículos.

Davilla elliptica St.-Hil. é conhecida popularmente como “lixinha” e ainda “seca-testículo” (comunicação pessoal). Pertencente à família Dilleniaceae, é empregada pela medicina tradicional para diferentes enfermidades como úlceras gástricas (RODRIGUES et al., 2008), hemorroidas, diarreias, ferimentos (SOARES et al., 2005) e ainda para tratamentos de orquites (BISO et al., 2010).

O testículo é dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular. O compartimento tubular é composto pelas células germinativas e as células de Sertoli, e é envolvido por uma lâmina basal e uma bainha de tecido conjuntivo, denominados de túnica própria (KARL e CAPEL, 1998; HERMO et al., 2010). Esse compartimento é responsável pela função exócrina do testículo, ou seja, a produção de espermatozoides. As células germinativas se desenvolvem e se diferenciam em espermatozoides na companhia das células de Sertoli, as quais regulam e propiciam um ambiente adequado e necessário para a espermatogênese (FRANÇA et al., 2016). A fertilidade masculina requer a produção, pelo testículo, de grande número de espermatozoides normais e, para isso, o parênquima testicular necessita estar sem alterações morfofisiológicas (DE KRETZER et al., 1998).

Os radicais livres estão envolvidos em processos biológicos (RICART-JANÉ et al., 2002), todavia, o desequilíbrio a favor da produção de radicais livres constitui importante mecanismo de agressão às células e tecidos (BRASILEIRO FILHO, 2011). Por meio de poderosas enzimas antioxidantes,

como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), o organismo consegue manter o equilíbrio com os mecanismos oxidantes (SIES et al., 1997). Ainda, antioxidantes exógenos, componentes da dieta, contribuem para a manutenção dos níveis de radicais livres (RIBEIRO et al., 2005). Entretanto, alguns tipos de alimentos podem induzir a liberação de radicais livres (BRASILEIRO FILHO, 2011). O óxido nítrico (ON*) está envolvido em importantes eventos biológicos, como o controle da dinâmica dos complexos juncionais da barreira testicular (GILIO et al., 2008), o que faz justo a sua quantificação em amostras. O malondialdeído (MDA) é um produto de peroxidação lipídica e sua mensuração permite conclusões sobre a ocorrência de estresse oxidativo no tecido (JANERO, 1990).

A análise da motilidade espermática permite uma avaliação morfofuncional dos espermatozoides, a qual pode ser correlacionada com a fertilidade. Essa análise pode ser feita subjetivamente, utilizando uma estimativa visual do número de espermatozoides móveis (VERSTEGEN et al., 2002).

Fitopreparados de *D. elliptica* são vastamente utilizados pela população para tratamento de diversas doenças, mas a literatura apresenta-se escassa quanto aos efeitos dessa planta nos testículos. Frente ao largo uso dessa planta, dita como medicinal pela população, fez-se necessária a avaliação da morfometria e estereologia do compartimento tubular, do estresse oxidativo dos testículos e da motilidade espermática de camundongos Swiss adultos, após exposição crônica à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico de *D. elliptica*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos extratos vegetais

Folhas de *Davilla elliptica* foram coletadas no Centro-Oeste do Brasil, região de Cerrado, no município de Jataí-GO e transportadas até a cidade de Viçosa-MG para obtenção dos extratos vegetais. A exsicata de *Davilla*

elliptica St.-Hil. foi depositada no herbário Jataiense (Registro HJ 1120) da Universidade Federal de Goiás (UFG) Regional Jataí.

As folhas foram secas em estufa (60°C) e pulverizadas em moinho de faca. A preparação dos extratos da folha de *D. elliptica* foi realizada no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

Quinhentos gramas de folhas secas e trituradas de *D. elliptica* foram submetidos à percolação exaustiva com solventes de polaridade crescente. A primeira extração foi feita com solvente apolar para a retirada de óleos, gorduras, esteróis e pigmentos, facilitando a posterior extração dos flavonoides. Inicialmente, a droga vegetal foi deixada em maceração por 24h com 2L de hexano, sendo retirado o percolado obtido. Subsequentemente a droga vegetal ficou por 24h em maceração com 2L de acetato de etila para obtenção da fração rica em flavonoides (FEFDE) (SIMÕES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008). O percolado obtido foi submetido à concentração no evaporador rotativo em temperatura de 50°C e deixado em capela. Por fim, foi feita a terceira extração, onde a droga vegetal foi deixada em maceração por 24h com 2L de álcool etílico (70%) e o percolado foi submetido a processo anterior descrito para obtenção do extrato hidroalcoólico (EHADE).

Os dois extratos de interesse, FEFDE e EHADE, foram retirados da capela quando apresentaram peso constante em três medições com intervalo de 30 minutos cada para ter confirmação da evaporação de todo solvente. Depois, foram depositados em ultrafreezer em temperatura de -80°C e liofilizados. Obteve-se rendimento de 3,83% de fração enriquecida e 20,19% de extrato hidroalcoólico.

2.2 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos de *D. elliptica* foi realizada no laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Utilizando-se cromatofolhas de sílica gel, os extratos foram testados para a presença de taninos, flavonoides, cumarinas, saponinas, óleos essenciais, triterpenos e esteroides, antraquinonas e alcaloides. A fase móvel utilizada para a fração

enriquecida em flavonoides foi 80% de diclorometano, 15% de acetato de etila e 5% de ácido fórmico. A fase móvel utilizada para o extrato hidroalcoólico foi 78% de acetato de etila, 5% de ácido acético, 5% de ácido fórmico e 12% de água. Utilizaram-se padrões e reveladores indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Padrões e reveladores utilizados para testar a presença de compostos químicos nos extratos da folha de *D. elliptica*.

Composto	Padrão	Revelador
Taninos	Ácido Pirogálico	Reagente de Barton
Flavonoides	Rutina	AlCl ₃
Cumarinas	Venalot	Reagente de Borntraeger (KOH 5%)
Saponinas	18-β-glicirretínico	Anisaldeído sulfúrico
Óleos essenciais	-	Anisaldeído sulfúrico
Triterpenos/ esteroides	β-sitosterol	Reagente de Lieberman- Burchard
Antraquinonas	1,8-diidroxiantraquinona	KOH 5%
Alcaloides	Quitina e cafeína	Reagente de Dragendorff

2.3 Tratamento

Os procedimentos experimentais seguiram as determinações da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sendo aprovado sob o protocolo 40/2015.

Foram utilizados 48 camundongos Swiss machos em idade reprodutiva (82 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (20°C-22°C) e fotoperíodo de 12h luz/escuro, permanecendo em período de aclimação por duas semanas. Foram oferecidas 10g de ração para cada animal diariamente e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais, sendo o controle com 12 animais e os grupos tratados com 6

animais e colocados em gaiolas coletivas. Seis animais receberam apenas água destilada (0,6mL/dia) e seis animais receberam 4% de DMSO (dimetilsulfóxido) em 0,6mL de água destilada (solução veículo). Como esses animais não foram diferentes estatisticamente entre si, foram realocados para o mesmo grupo, resultando no grupo controle (G1) com 12 animais; Grupos 2, 3 e 4 receberam fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) da folha de *D. elliptica* nas concentrações de 100, 200 e 400mg/Kg, respectivamente, diluídos em solução veículo; Grupos 5, 6 e 7 receberam extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica* nas concentrações de 100, 200 e 400mg/Kg, respectivamente, diluídos em 0,6mL de água destilada. Os animais foram pesados semanalmente e as doses ajustadas. Todo o tratamento foi administrado por gavagem e teve duração de 42 dias.

2.4 Coleta de amostras e biometrias corporal e testicular

Depois de 24h da última gavagem, os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se tiopental 30mg/kg, intraperitoneal. A eutanásia foi realizada através de punção cardíaca, sendo o sangue centrifugado e o plasma armazenado para análises posteriores. Em seguida, os testículos foram removidos e aqueles destinados a análises morfométricas foram fixados em solução de Karnovsky. Aqueles destinados a análises bioquímicas foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C). Os testículos foram pesados após fixação em balança de precisão (BEL Mark 160/0,0001g).

Fragmento do testículo fixado foi utilizado para calcular o percentual líquido. Essa análise foi feita pela diferença de massa fresca e a massa seca do órgão, sendo a massa seca obtida após secagem do órgão em estufa a 70°C, até atingir peso seco constante.

Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular, foi calculado o índice gonadossomático (IGS), a partir da equação: $IGS (\%) = PG / PC \times 100$, onde PG= Peso total das gônadas e PC= Peso corporal. Baseado nos pesos do parênquima testicular e corporal, foi calculado o índice parenquimossomático

(IPS), a partir da equação: $IPS (\%) = PTPT / PC \times 100$, onde PTPT= Peso do parênquima dos dois testículos e PC= Peso corporal.

2.5 Microscopia de luz

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens dos túbulos seminíferos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa ImageJ.

2.6 Análise histopatológica qualitativa

A análise patológica qualitativa foi realizada sob microscopia de luz em preparações histológicas testiculares. Foram avaliados 24 cortes testiculares por animal, de cada grupo. O parênquima tubular foi investigado para a presença ou ausência de vacúolos e descamação do epitélio seminífero. Foram procurados túbulos com perda total do epitélio seminífero, sendo este delimitado somente pela presença da túnica própria.

2.7 Análise morfométrica e estereológica

2.7.1 Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular, volume dos componentes do túbulo, índices tubulossomático e epiteliossomático

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 2.660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100X, realizando-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos, nas preparações histológicas do testículo de cada animal.

Foram anotados pontos sobre as estruturas do parênquima testicular, como túbulo seminífero, especificando-se aqueles sobre a túnica própria, o epitélio seminífero e lúmen, e sobre o compartimento intertubular. A proporção volumétrica tubular e dos componentes que compõe o túbulo foi

calculada, utilizando-se a seguinte equação: Proporção volumétrica (%) = (NT / NTT) x 100, onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o túbulo ou componente e NTT= Número de pontos totais contados.

Para cálculo dos volumes de túbulo seminífero, epitélio seminífero, túnica própria e lúmen tubular utilizou-se a equação: Volume = % do elemento x PPT / 100, onde PPT= Peso do parênquima de 1 testículo.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da equação: ITS = VTS / PC x 100, onde VTS= Volume de túbulo seminífero dos testículos e PC= Peso corporal. Baseado nos volumes de epitélios seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice epiteliossomático (IES) a partir da fórmula IES = VES / PC x 100, onde VES= Volume de epitélio seminífero dos testículos e PC= Peso corporal.

O volume do testículo foi considerado igual ao peso, pois se entende que a densidade testicular está próxima de 1 em mamíferos (JOHNSON et al., 1981; COSTA et al., 2011).

2.7.2 Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio (μm) por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, sem se considerar o estágio do ciclo do epitélio seminífero. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero (μm) a partir da túnica própria até o lúmen tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas de forma diametralmente opostas.

2.7.3 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo

O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a seguinte equação: CTT= VTS / πR^2 , onde VTS= Volume total de túbulos

seminíferos dos dois testículos, $\pi R^2 =$ Área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R= diâmetro tubular / 2.

O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da equação: $CTT/g = CTT / PG$, onde CTT= Comprimento total de túbulos seminíferos e PG= Peso das gônadas.

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

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio I do ciclo, classificado de acordo com o método da morfologia tubular (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; ROOSEN-RUNGE, 1955; SWIERSTRA, 1968; BERNDTSON, 1977) foi feita a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Foram contados núcleos de espermatogônias, espermatócito I na fase de preleptóteno/leptóteno, espermatócito I na fase de paquíteno, espermátides arredondadas e nucléolos evidentes de Sertoli de 20 secções transversais de túbulos no estágio I para cada animal.

As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear (DM) e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie, (1946) modificada por Amann e Almqvist (1962), sendo NCEI= número corrigido de células do estágio 1:

$$NCEI = \text{Contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do Corte}}{\text{Espessura do Corte} + \sqrt{\left[\frac{DM}{2}\right]^2 - \left[\frac{DM}{4}\right]^2}}$$

Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celulares estudados, para cada animal, em aumento de 400x. Para a espermatogônia, que apresenta núcleo ovoide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o diâmetro nuclear maior e menor. Como o núcleo da célula de Sertoli é irregular, foi medido o seu nucléolo. O número de células de Sertoli foi corrigido para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Assim, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente (AMANN e ALMQUIST, 1962).

2.7.5 Razões entre os números celulares

Para a avaliação da eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e entre estes números e o número de células de Sertoli no estágio I do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram utilizadas:

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

2.7.6 Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo

A estimativa do número de células de Sertoli por testículo (CST) foi realizada a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, de acordo com a equação (HOCHEREAU-DE REVIERS e LINCOLN, 1978): $CST = (CTT/T \times SER) / EC$, onde CTT/T= Comprimento total de túbulo por testículo, SER= Número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal e EC= Espessura do corte. O número de células de Sertoli por grama de testículo (CS/gT) foi calculado a partir da equação: $CS/gT = CST / PT$, onde PT= Peso testicular.

2.7.7 Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo

A produção espermática diária (PED) por testículo estimada de acordo com a seguinte equação desenvolvida por Amann, (1970): $PED = (VTS \times EAR) / (DC \times AST \times EC)$, onde: VTS= Volume total de túbulos seminíferos (μm),

EAR= Número corrigido de espermátides arredondadas, DC= Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias), AST= Área da secção transversal do túbulo seminífero e EC= Espessura do corte histológico. A produção espermática diária por grama de testículo (PED/g) foi obtida a partir da fórmula: $PED/gT = PED / PT$, onde PT: peso testicular.

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

2.8 Estresse oxidativo

2.8.1 Análises das enzimas antioxidantes

Cem miligramas do tecido testicular de camundongos Swiss tratados com fração enriquecida em flavonoides e extrato hidroalcoólico da folha de *D. elliptica* foram homogeneizados em 1000 μ L de tampão fosfato (pH 7.4). A suspensão foi centrifugada (12000 rpm à 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante utilizado nas análises.

A atividade enzimática da CAT foi mensurada segundo Aebi et al., (1984) pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e homogenato de tecido em espectrofotômetro (λ = 240 nm). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $e_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados expressos em U CAT/mg proteína.

A atividade enzimática da SOD foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm baseado na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido O₂⁻ e H₂O₂ e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (DIETERICH et al., 2000). Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

A atividade enzimática da GST foi mensurada de acordo com Habig et al. (1974), através da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada em uma mistura contendo CDNB 1 mM em etanol, Glutathione Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e homogenato de tecido pelo aumento da absorbância (λ = 340 nm) por 90 segundos. O coeficiente de extinção molar do CDNB $e_{340} =$

9,6 mM⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em μmol/min/g.

2.8.2 Oxido nítrico (ON)

O homogenato dos tecidos para os testes de ON foi preparado como descrito acima para as enzimas. O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H₃PO₄. Desta forma, 50μL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida foi determinada em leitor de microplacas (λ= 540 nm). A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μM (RICART-JANÉ et al., 2002; DROGE, 2002).

2.8.3 Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeido (MDA)

O homogenato dos tecidos para os testes de MDA foi preparado como descrito para as enzimas. Foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e ácido clorídrico 0,25 M), pois as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o MDA importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. Posteriormente foi aquecido em água fervente por 40 minutos a temperatura de 90°C, resfriados, adicionado álcool butílico (600mL), agitado em vortex e centrifugados a 6000 rpm. A fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas (λ = 532 nm). A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em μM/mg proteína (BUEGE e AUST, 1978).

2.8.4 Proteína Total

A proteína total dos sobrenadantes de SOD, CAT e MDA foi mensurada (LOWRY et al., 1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

2.9 Motilidade espermática

A cauda do epidídimo esquerdo foi seccionada diversas vezes, em placa de Petri, para se obter um fluido rico em espermatozoides. Posteriormente, o fluido foi diluído em 200 μ L de Tris-citrato-frutose (3,025g de Tris, 1,7g de ácido cítrico, 1,25g de frutose e 100mL de água destilada) a 37°C, sendo retiradas alíquotas para análises da motilidade.

A motilidade espermática foi analisada em microscópio de luz com ampliação de 400X. Espermatozoides foram classificados como móveis ou imóveis e a motilidade total foi expressa em porcentagem.

2.10 Análises estatísticas

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

3. RESULTADOS

3.1 Prospecção fitoquímica

Na Tabela 2 encontram-se os resultados referentes à pesquisa qualitativa de metabólitos secundários realizada nos extratos vegetais obtidos das folhas de *D. elliptica*. Foram encontrados na fração enriquecida em flavonoides taninos, flavonoides, saponinas e óleos essenciais. O extrato hidroalcoólico teve presença confirmada de taninos, saponinas e óleos essenciais.

Tabela 2. Distribuição de metabólitos secundários na fração enriquecida em flavonoides e no extrato hidroalcoólico da folha de *D. elliptica*.

Metabólitos secundários	FEFDE	EHADE
Taninos	+	+
Flavonoides	+	-
Cumarinas	-	-
Saponinas	+	+
Óleos essenciais	+	+
Triterpenos e esteroides	-	-
Antraquinonas	-	-
Alcaloides	-	-

FEFDE = Fração enriquecida em flavonoides. EHADE = Extrato hidroalcoólico. (+) presente, (-) ausente.

3.2 Biometria corporal e testicular

Os dados biométricos corporal e testicular encontram-se dispostos na Tabela 3. Os grupos que receberam EHADE nas concentrações de 200mg/Kg e 400mg/Kg tiveram diminuição do peso corporal em 14,94% e 17,13%, respectivamente, comparados com o controle. O peso testicular não sofreu alteração com o tratamento. O peso do parênquima de 1 testículo diminuiu em G3, G4 e G7, em 20%, 30% e 20%, respectivamente, em relação ao controle. Quanto ao peso da albugínea, apresentou aumento em G4, G6 e G7 de 100%, 50% e 100%, respectivamente, em relação ao controle. O percentual líquido não foi alterado com o tratamento.

Tabela 3. Parâmetros biométricos corporal e testicular e percentual líquido do testículo de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

G	PC (g)	PT (g)	PPT (g)	PA (g)	PL
G1	43,44±3,84 ^a	0,12±0,02 ^a	0,10±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	75,98±4,82 ^a
G2	46,04±4,39 ^a	0,13±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	0,02±0,00 ^a	85,28±6,49 ^a
G3	40,67±3,32 ^a	0,10±0,02 ^a	0,08±0,02 ^b	0,02±0,00 ^a	86,53±5,69 ^a
G4	39,30±2,39 ^a	0,11±0,01 ^a	0,07±0,01 ^b	0,04±0,00 ^b	85,75±8,46 ^a
G5	39,43±3,62 ^a	0,12±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	81,37±4,45 ^a
G6	36,95±4,65 ^b	0,12±0,02 ^a	0,08±0,02 ^a	0,03±0,01 ^b	71,00±11,19 ^a
G7	36,00±3,21 ^b	0,11±0,01 ^a	0,08±0,01 ^b	0,04±0,00 ^b	81,35±7,70 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. G- Grupos; PC- Peso corporal; PT- Peso testicular; PPT- Peso do parênquima de 1 testículo; PA- Peso da albugínea; PL- Percentual líquido. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle (p≤0,05).

3.3 Histopatologia qualitativa

Na Figura 2 encontram-se os principais achados nessa investigação. Na busca por alterações na organização do túbulo seminífero dos animais tratados com a fração enriquecida em flavonoides e o extrato hidroalcoólico da folha de *D. elliptica* foram procurados por vacúolos e descamações no epitélio seminífero. Todos os grupos envolvidos apresentaram organização morfológica na maioria dos túbulos seminíferos. O grupo controle apresentou pequenos vacúolos e raros túbulos com descamação inicial em algumas secções tubulares, característica presente nos grupos tratados. Contudo, no grupo 2 foi encontrado túbulos com grandes vacúolos, e descamação intermediária e avançada. Nesse grupo também foram encontrados alguns túbulos com perda total do epitélio seminífero, o que caracteriza a fase final da descamação. O grupo 3 apresentou secções tubulares com descamação avançada mais frequente que o grupo 2, entretanto, não foi visualizado túbulo com perda total do epitélio seminífero. Animais do grupo 4 apresentaram muitos vacúolos no epitélio seminífero, e alguns túbulos com descamação avançada e perda total do epitélio. Os grupos 5 e 6 apresentaram desorganização do epitélio seminífero, com raros túbulos entre descamação avançada e perda total do

epitélio seminífero. Ainda, foi visto epitélio no centro do túbulo do grupo 5. A presença de vacúolos nos túbulos dos animais do grupo 5 foi baixa-intermediária, e dos animais do grupo 6 foi baixa. No grupo 7 não foram encontrados túbulos com perda total do epitélio seminífero, embora foram vistos pequenos vacúolos e descamação intermediária em alguns túbulos. Os túbulos com descamação avançada, e sem epitélio seminífero foram localizados próximos à veia testicular, com diâmetro tubular aparentemente menor, pois foram espremidos pelos túbulos adjacentes.

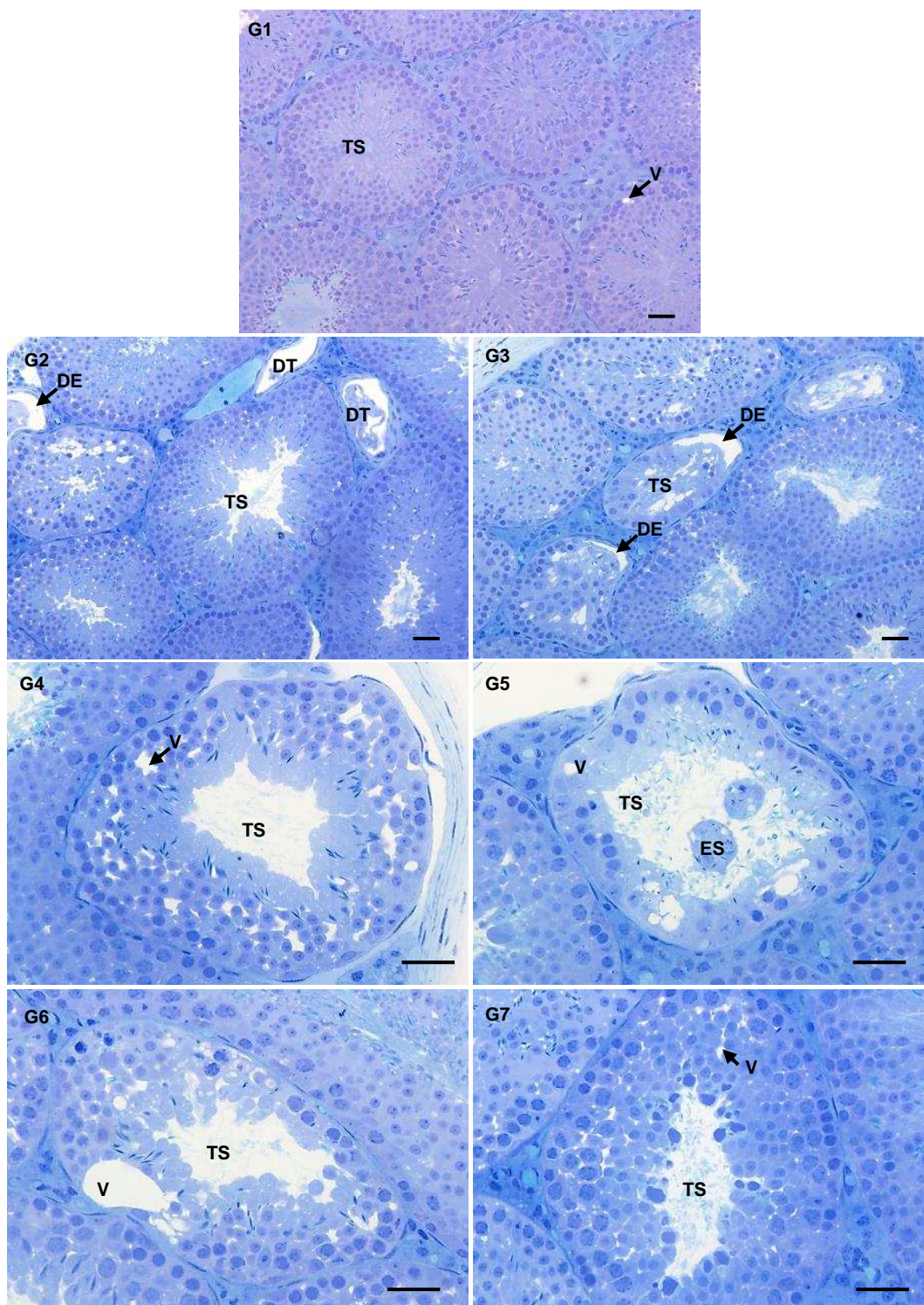


Figura 1. Fotomicrografias do parênquima testicular de camundongos Swiss tratados com fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*. G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. TS- Túbulos seminíferos; V- Vacúolos; DE- Descamação; DT- Desprendimento total do epitélio seminífero; ES- Epitélio seminífero no centro do túbulo. Coloração: azul de toluidina/borato de sódio 1%. Barras = 20µm.

3.4 Morfometria e estereologia

Os índices somáticos estão apresentados na Tabela 4. Todos os grupos tratados não variaram significativamente com o controle quanto ao IGS. O G4 teve redução de 17,78% no IPS, 21,43% no ITS e 23,08% no IES em relação ao controle.

Tabela 4. Índice gonadossomático (IGS), índice parenquimossomático (IPS), índice tubulossomático (ITS) e índice epiteliossomático (IES) de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	IGS (%)	IPS (%)	ITS (%)	IES (%)
G1	0,56±0,07 ^a	0,45±0,06 ^a	0,42±0,05 ^a	0,39±0,05 ^a
G2	0,57±0,04 ^a	0,48±0,04 ^a	0,44±0,04 ^a	0,41±0,04 ^a
G3	0,49±0,07 ^a	0,39±0,08 ^a	0,35±0,07 ^a	0,32±0,08 ^a
G4	0,56±0,05 ^a	0,37±0,05 ^b	0,33±0,05 ^b	0,30±0,05 ^b
G5	0,62±0,02 ^a	0,50±0,04 ^a	0,45±0,05 ^a	0,42±0,05 ^a
G6	0,63±0,09 ^a	0,46±0,06 ^a	0,41±0,06 ^a	0,38±0,06 ^a
G7	0,63±0,07 ^a	0,42±0,05 ^a	0,38±0,05 ^a	0,35±0,04 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

A proporção volumétrica dos componentes tubulares está apresentada na Tabela 5. A porcentagem de túbulo, de epitélio e de lúmen não variaram significativamente com o tratamento. A proporção volumétrica da túnica própria no G4 reduziu 38,07% em relação ao controle.

Tabela 5. Proporção volumétrica dos componentes tubulares de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	TS (%)	ES (%)	TP (%)	LT (%)
G1	91,76±1,35 ^a	85,12±1,82 ^a	1,55±0,38 ^a	5,09±1,87 ^a
G2	90,97±0,70 ^a	84,82±0,78 ^a	1,13±0,08 ^a	5,01±0,31 ^a
G3	89,44±2,42 ^a	83,65±1,25 ^a	1,03±0,23 ^a	4,77±2,36 ^a
G4	89,24±1,97 ^a	82,87±2,64 ^a	0,96±0,42 ^b	5,41±1,90 ^a
G5	90,34±2,09 ^a	84,96±2,93 ^a	1,37±0,40 ^a	4,02±1,25 ^a
G6	89,91±1,89 ^a	83,90±1,35 ^a	1,13±0,16 ^a	4,87±1,15 ^a
G7	90,11±2,05 ^a	82,69±1,66 ^a	1,32±0,35 ^a	6,10±1,74 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Proporção volumétrica de túbulo seminífero (TS), epitélio seminífero (ES), túnica própria (TP) e de lúmen tubular (LT). Dados expressos como média±DP. Letras minúsculas diferentes indicam diferença dos grupos tratados com o controle, letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos tratados (p≤0,05).

Na Tabela 6 são vistos os volumes dos componentes tubulares por testículo. Os grupos 3, 4 e 7 tiveram redução no volume do túbulo seminífero de 21,19%, 28,35% e 24,52%, respectivamente, e redução no volume de epitélio de 20,73%, 28,35% e 25,40%, respectivamente, em relação ao controle. O volume da túnica própria reduziu 45,33%, 51,33%, 35,33% e 33,33% em G3, G4, G6 e G7, respectivamente, em comparação com o controle. O volume do lúmen tubular não foi alterado estatisticamente com o tratamento;

Tabela 6. Volume dos componentes tubulares por testículo de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	VTS (µL)	VES (µL)	VTP (µL)	VLT (µL)
G1	89,73±9,13 ^a	83,27±8,98 ^a	1,50±0,32 ^a	4,95±1,81 ^a
G2	100,67±12,44 ^a	93,87±11,62 ^a	1,25±0,12 ^a	5,55±0,80 ^a
G3	70,72±16,24 ^b	66,01±14,82 ^b	0,82±0,27 ^b	3,89±2,17 ^a
G4	64,29±11,70 ^b	59,66±10,75 ^b	0,73±0,41 ^b	3,90±1,59 ^a
G5	88,97±12,90 ^a	83,75±12,89 ^a	1,34±0,43 ^a	3,88±0,91 ^a
G6	75,82±14,80 ^a	70,78±13,90 ^a	0,97±0,28 ^b	4,07±1,01 ^a
G7	67,73±9,40 ^b	62,12±8,20 ^b	1,00±0,33 ^b	4,62±1,54 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Volume de túbulo seminífero (VTS), epitélio seminífero (VES), túnica própria (VTP) e de lúmen tubular (VLT). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle (p≤0,05).

Encontram-se na Tabela 7 o diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento total dos túbulos seminíferos nos testículos e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo. O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero não diferiram estatisticamente com o tratamento. O CTT teve redução de 29,66% e 24,96% em G4 e G7, respectivamente, em relação ao controle. No parâmetro CTT/g o G4 reduziu 24,51% em comparação com o controle.

Tabela 7. Diâmetro tubular (DT), altura de epitélio seminífero (AE), comprimento total dos túbulos seminíferos nos testículos (CTT) e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo (CTT/g) de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	DT (μm)	AE (μm)	CTT (m)	CTT/g (m)
G1	203,89 \pm 12,37 ^a	136,20 \pm 6,80 ^a	5,53 \pm 0,73 ^a	23,01 \pm 2,40 ^a
G2	211,21 \pm 17,04 ^a	139,17 \pm 5,63 ^a	5,85 \pm 1,19 ^a	22,42 \pm 3,42 ^a
G3	205,59 \pm 11,71 ^a	136,73 \pm 11,37 ^a	4,26 \pm 0,98 ^a	21,13 \pm 2,47 ^a
G4	206,62 \pm 11,51 ^a	137,73 \pm 9,65 ^a	3,89 \pm 0,97 ^b	17,37 \pm 2,56 ^b
G5	213,91 \pm 11,18 ^a	144,04 \pm 9,34 ^a	4,97 \pm 0,76 ^a	20,28 \pm 2,44 ^a
G6	199,27 \pm 15,58 ^a	130,63 \pm 6,75 ^a	4,87 \pm 0,75 ^a	21,21 \pm 3,14 ^a
G7	205,62 \pm 18,85 ^a	136,12 \pm 12,59 ^a	4,15 \pm 0,79 ^b	18,53 \pm 3,66 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 8 podem ser vistos os números corrigidos de células do estágio 1. O número corrigido de espermatogônia diminuiu em G2, G5, G6 e G7 em 28,07%, 36,84%, 49,12% e 47,37%, respectivamente, quando comparado com o controle. O número corrigido de espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, de espermatócitos primários em paquíteno, de espermatídes arredondadas e de células germinativas não variou significativamente em comparação com o controle.

Tabela 8. Números corrigidos de espermatogônias (ESP), de espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno (PL/L), de espermatócitos primários em paquíteno (PAQ), de espermatídes arredondadas (EAR) e número total de células germinativas (TCG) de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	ESP	PL/L	PAQ	EAR	TCG
G1	0,57±0,15 ^a	16,59±2,65 ^a	19,70±2,18 ^a	45,63±7,38 ^a	82,48±11,58 ^a
G2	0,41±0,15 ^b	18,88±1,55 ^a	22,12±2,11 ^a	47,27±3,75 ^a	88,68±6,18 ^a
G3	0,41±0,08 ^a	18,22±1,56 ^a	20,77±2,98 ^a	44,34±4,90 ^a	83,73±0,09 ^a
G4	0,39±0,12 ^a	17,00±1,49 ^a	19,10±1,66 ^a	42,47±6,18 ^a	78,96±8,37 ^a
G5	0,36±0,12 ^b	17,99±2,57 ^a	21,36±3,02 ^a	47,12±8,94 ^a	86,83±14,09 ^a
G6	0,29±0,10 ^b	15,75±1,56 ^a	18,99±1,66 ^a	41,81±6,78 ^a	76,83±9,44 ^a
G7	0,30±0,09 ^b	17,30±3,82 ^a	20,44±4,26 ^a	44,76±7,25 ^a	82,80±14,92 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 9 são mostrados o índice mitótico, índice meiótico, produção espermática diária por testículo e por grama de testículo. O índice mitótico teve aumento em G6 e G7 em 94,31% e 97,91%, respectivamente, quando comparados com o controle. O índice meiótico e a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo mantiveram-se sem alterações significativas.

Tabela 9. Índice mitótico (IMI), índice meiótico (IME), produção espermática diária por testículo (PED) e por grama de testículo (PED/gT), de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	IMI	IME	PED*10 ⁶	PED/gT*10 ⁶
G1	30,59±8,38 ^a	2,31±0,16 ^a	4,65±1,01 ^a	39,69±7,62 ^a
G2	50,17±16,57 ^a	2,14±0,17 ^a	5,10±0,96 ^a	39,19±6,93 ^a
G3	45,91±8,08 ^a	2,15±0,19 ^a	3,56±1,12 ^a	35,49±6,52 ^a
G4	47,08±15,77 ^a	2,22±0,22 ^a	3,15±0,67 ^a	27,66±3,27 ^a
G5	53,81±13,81 ^a	2,20±0,23 ^a	4,16±1,13 ^a	34,21±7,61 ^a
G6	59,44±17,63 ^b	2,20±0,24 ^a	4,00±0,86 ^a	33,88±6,76 ^a
G7	60,54±14,33 ^b	2,21±0,24 ^a	3,44±0,51 ^a	30,17±2,61 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

Parâmetros relacionados às células de Sertoli e rendimento geral da espermatogênese estão apresentados na Tabela 10. O índice de célula de Sertoli aumentou 44,14% em G2 quando comparado com o controle, e esse mesmo grupo teve aumento de 49,41% da capacidade total de suporte em relação ao controle. O número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo não sofreu alteração com o tratamento. O rendimento geral da espermatogênese teve aumento de 88,76% e 88,57%, em G6 e G7, respectivamente, em comparação com o controle.

Tabela 10. Índice de célula de Sertoli (ICS), número de células de Sertoli por testículo (CST) e por grama de testículo (CS/gT), capacidade total de suporte da célula de Sertoli (CTS) e rendimento geral da espermatogênese (RGE) de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	ICS	CST*10 ⁶	CS/gT*10 ⁶	CTS	RGE
G1	9,04±1,74 ^a	4,76±1,33 ^a	40,86±11,62 ^a	16,37±3,17 ^a	83,89±20,74 ^a
G2	13,03±3,42 ^b	3,79±1,51 ^a	29,61±13,55 ^a	24,46±6,52 ^b	127,07±47,79 ^a
G3	7,90±1,37 ^a	4,01±0,98 ^a	40,59±4,81 ^a	14,90±2,20 ^a	110,49±11,57 ^a
G4	8,88±1,98 ^a	3,22±0,50 ^a	28,54±3,07 ^a	16,52±3,40 ^a	118,86±48,03 ^a
G5	10,41±1,85 ^a	3,58±0,68 ^a	29,45±2,98 ^a	19,19±2,91 ^a	139,92±37,16 ^a
G6	9,54±1,38 ^a	3,79±0,71 ^a	32,23±5,73 ^a	17,63±2,81 ^a	158,35±52,09 ^b
G7	8,12±0,95 ^a	3,86±0,79 ^a	33,67±3,69 ^a	14,95±1,20 ^a	158,19±38,46 ^b

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

3.5 Estresse oxidativo

3.5.1 Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes analisadas nesse estudo é mostrada na Figura 3. A atividade da CAT não alterou significativamente com o tratamento. A atividade da SOD teve aumento de 88,81% no G4 quando comparado com o controle. Os grupos que receberam FEFDE nas concentrações de 100, 200 e 400mg tiveram a atividade da GST reduzida em

29,19%, 31,58% e 42,36%, respectivamente. Ao passo que os grupos que receberam EHADE nas concentrações de 100, 200 e 400mg tiveram redução da atividade da GST de 30,17%, 23,98% e 29,81%, respectivamente em relação ao controle.

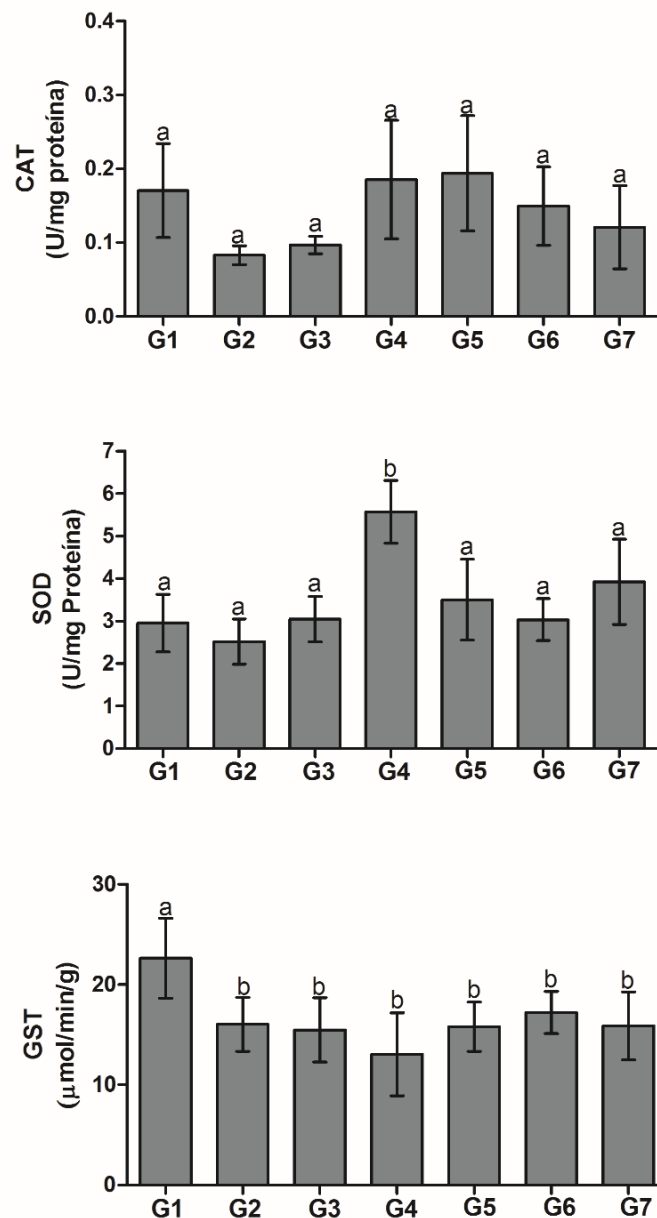


Figura 2. Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST) nos testículos de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*. G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

3.5.2 Óxido nítrico e Malondialdeído

As concentrações de óxido nítrico e de malondialdeído no testículo estão apresentadas na Figura 4. Nenhum grupo tratado teve as concentrações de ON e de MDA alteradas com o tratamento.

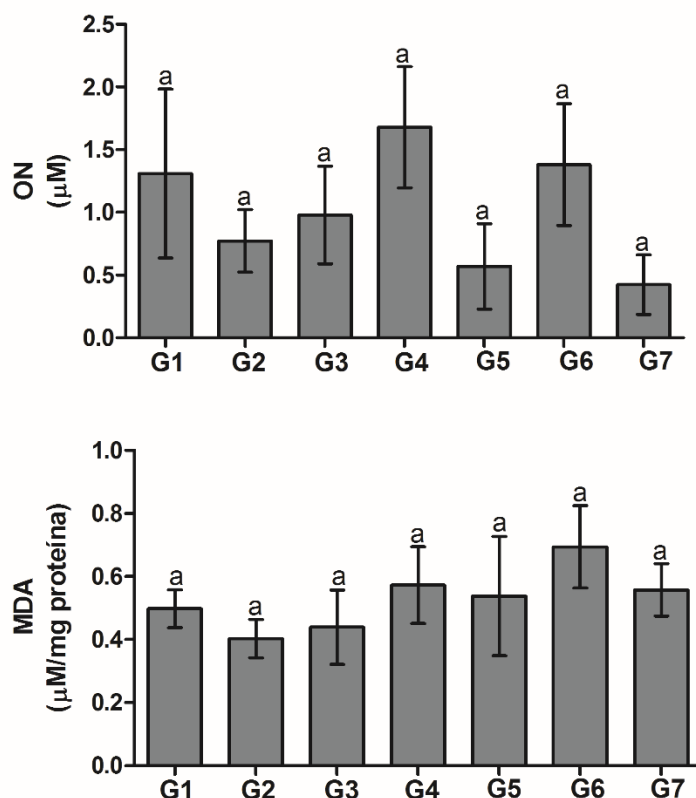


Figura 3. Concentrações de óxido nítrico (ON) e de malondialdeído (MDA) nos testículos de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*. G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p\leq 0,05$).

3.6 Motilidade espermática

A motilidade espermática, de todos os grupos tratados, apresentou redução quando comparada com a do controle (Figura 1). Os grupos tratados com FEFDE 100, 200 e 400mg/Kg tiveram a motilidade espermática reduzida em 35,86%, 37,64% e 49,89% respectivamente. Os grupos tratados com EHADE 100, 200 e 400mg/Kg tiveram a motilidade espermática reduzida em 36,64%, 25,16% e 62,25%, respectivamente.

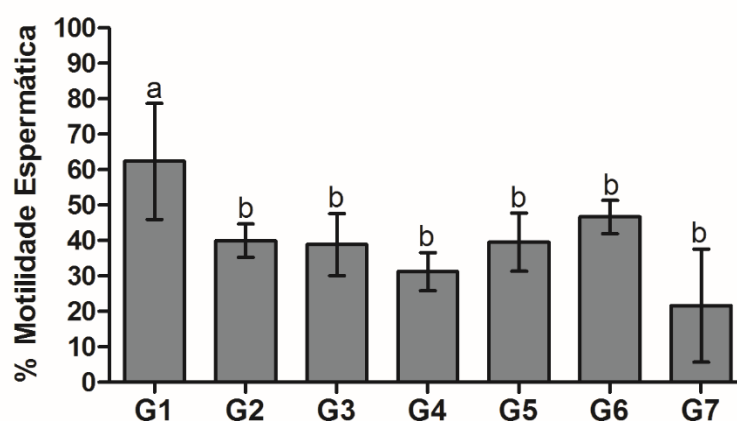


Figura 4. Motilidade espermática de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*. G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Foram pesquisados a presença de metabólitos secundários nos dois extratos testados, sendo confirmados taninos, saponinas e óleos essenciais em ambos, e flavonoides na FEFDE. Soares et al. (2005) também encontraram taninos, saponinas e flavonoides em folhas de *D. elliptica*, e um estudo farmacognóstico detectou a presença de taninos e flavonoides (JACÓME et al., 2010). A não confirmação de flavonoides no EHADE do presente trabalho é justificada pela percolação exaustiva de polaridade crescente. Ainda, os flavonoides têm solubilidade reduzida em água, desse modo, a extração hidroalcoólica (70%), provavelmente, reduziu a quantidade/presença de flavonoides extraídos (BISO, 2008).

Plantas medicinais contendo taninos são indicadas, embora tenha capacidade de ligar-se às proteínas, podendo ser tóxicas (MONTEIRO et al., 2005). As saponinas conseguem influenciar na permeabilidade da membrana celular, pois interagem com o colesterol, podendo ser citotóxicas (ARABSKI et al., 2012; CARVALHO et al., 2012). Fração rica em flavonoides da semente de *Vitex negundo* causou diminuição do diâmetro tubular de cães e perdas das células germinativas, escapando da degeneração espermatogônias e células de Sertoli. Todavia, seu efeito foi minimizado pelo propionato de testosterona, o que

levou a sugestão dessa fração ser utilizada como antagonista da espermatogênese (BHARGAVA, 1989). Perdas das células germinativas também foi verificada com a administração de FEFDE. Essa alteração foi observada em menor grau que quando comparada com a administração de EHADE. Foi vista apenas em alguns túbulos seminíferos, contudo, as espermatogônias e as células de Sertoli não foram dispensadas da degeneração. Farnsworth e Waller (1982) examinaram grande número de plantas com propriedades espermicidas e relataram que a maioria continha saponinas e flavonoides. Em contraste, um estudo feito com óleo essencial de *Satureja khuzestanica* demonstrou que esse metabólito secundário pareceu benéfico para a fertilidade de ratos machos, com aumento do peso do testículo, número de espermatogônias, cordões de espermátides e espermatozoides (HAERI et al., 2006).

Mello (2001) traz que a toxicidade sistêmica pode ser diagnosticada por alterações na massa corporal, diminuição do desenvolvimento ponderal, e ainda alterações comportamentais como diminuição do consumo de água e pelos arrepiados dos animais. As maiores doses de EHADE provocaram diminuição do peso corporal dos animais tratados. No entanto, não foram observadas alterações comportamentais ao longo do experimento e a massa corporal dos animais está dentro do intervalo de peso normal para a espécie (NEVES, 2013). Resultados semelhantes, com diminuição do peso corporal e diagnóstico de normalidade podem ser verificados em Freitas et al. (2011). Ainda, a manutenção do peso testicular, em geral, estabelece correlação positiva com a produção espermática (FRANÇA e RUSSELL, 1998), o que foi verificado, uma vez que a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo, em termos numéricos, não foi alterada.

O IGS representa o percentual de massa corporal alocado em gônadas (MONTEIRO et al., 2012). O IGS inalterado pode ser justificado pela manutenção do peso testicular, porque mesmo com a redução do peso corporal em G6 e G7 não alterou o percentual de massa corporal alocado nas gônadas. Melo et al. (2010) encontraram diferença no peso testicular entre os grupos, mas a massa corporal permaneceu, o que não alterou o IGS. O IGS inalterado

significativamente também foi observado por Matta (2008) com a administração do extrato da raiz de *Ouratea semiserrata*.

A diminuição do peso do parênquima provocada pelas maiores doses de FEFDE e a maior dose de EHADE foi ocasionada pela diminuição do comprimento total de túbulos que reduziu em G4 e G7 e foi menor em G3. De maneira compensatória, as maiores concentrações testadas dos dois extratos aumentaram o peso da albugínea, o que provavelmente manteve o peso testicular nesses grupos. A diminuição do comprimento total de túbulos também provocou diminuição do volume de epitélio, e conseqüentemente, o volume de túbulo nesses grupos tratados. Uma vez que o volume do intertúbulo não apresentou alteração com o tratamento (dados apresentados no capítulo 2), nem o diâmetro tubular e nem a altura de epitélio seminífero, é possível sugerir que as maiores doses da FEFDE e a maior dose de EHADE influenciaram no comprimento total de túbulos seminíferos o que desencadeou as outras alterações testiculares descritas. Essa alteração morfométrica foi melhor desencadeada pela maior concentração de FEFDE quando comparada com os outros tratamentos. Ela provocou ainda a redução do IPS, ITS e IES, que demonstram o percentual de massa corporal alocado em parênquima, túbulos seminíferos e epitélio seminífero, respectivamente. Melo et al. (2010) encontraram aumento significativo no peso do parênquima em ratos administrados com extrato de *Tynnanthus fasciculatus* por consequência do aumento do volume e comprimento do túbulo. Esses padrões podem conduzir maior eficiência espermatogênica, padrões estes diferentes dos observados nesse estudo, o que permite a sugestão de que o tratamento causou uma deficiência espermatogênica.

Em ratos, aproximadamente 90% do parênquima testicular é ocupado por túbulos seminíferos e 10% por tecido intertubular (RUSSELL e FRANÇA, 1995). A proporção volumétrica tubular manteve-se como descrito pela literatura. A alteração vista na proporção volumétrica dos componentes tubulares foi a diminuição da proporção de túnica própria em G4 e do volume da túnica em G3, G4, G6 e G7. A redução da túnica própria possivelmente favoreceu à entrada dos compostos da planta nos túbulos seminíferos. O que pode ter levado às alterações vistas nesse estudo, em alguns grupos, como

diminuição do comprimento total de túbulo, o que pode ter contribuído para alterações no processo espermatogênico.

Substâncias tóxicas ou seus produtos originados no organismo podem atravessar a barreira testicular, atuar sobre as células germinativas e causar interferência na espermatogênese. Reduções no número e produção diária dos espermatozoides podem ser originados de lesões do epitélio germinativo (CASTRO et al., 2005). Foi observado que ambos os extratos de *D. elliptica* foram capazes de reduzir o número de espermatogônias, embora o EHADE mostrou-se mais eficiente, pois as três doses testadas desencadearam redução, enquanto que essa diminuição foi observada somente com a menor dose de FEFDE. Apesar da redução do número de espermatogônias em G6 e G7, foram mantidas as espermátides arredondadas e os espermatócitos primários devido ao aumento do índice mitótico e manutenção do índice meiótico, o que levou ao aumento do rendimento geral da espermatogênese. O G2 teve o maior número de células germinativas, que mesmo não sendo significativo, refletiu no aumento do índice de Sertoli e a capacidade total de suporte dessa célula, uma vez que o número de células de Sertoli não foi alterado.

O estresse oxidativo é um fator importante na etiologia da infertilidade masculina. Nesse estudo, a concentração de ON manteve-se com o tratamento, assim como a concentração de MDA. A atividade da SOD é predominante nos túbulos seminíferos, enquanto que a atividade da CAT é superior no intertúbulo (AITKEN e ROMAN, 2008). A manutenção da atividade da CAT reflete as condições histológicas normais do espaço intertubular (Dados apresentados no cap. 2), entretanto, o aumento da atividade da SOD em G4 é possivelmente uma resposta do compartimento tubular as alterações vistas principalmente nesse grupo, decorrentes de maior produção de radicais livres. A redução da GST vista nesse estudo pode indicar danos oxidativos, pois extratos vegetais, quando metabolizados pelas células, podem inibir a atividade dessa enzima (AITKEN e ROMAN, 2008). Existem mecanismos antioxidantes não enzimáticos nos testículos, principalmente a vitamina E (FALLAHI et al., 2015), que pode ter atuado na manutenção dos níveis de óxido nítrico e do produto de peroxidação lipídica.

A motilidade espermática sofreu redução em todos os tratamentos. Os espermatozoides ganham motilidade após a formação nos testículos e a maturação no epidídimo. Por outro lado, qualquer modificação patológica estrutural ou funcional na membrana dos espermatozoides reduz sua capacidade fecundante (SHUM et al., 2009). As saponinas, por interagirem com lipídeos de membrana, podem reduzir a motilidade dos espermatozoides. (ARABSKI et al., 2012; LU et al., 2013). Extratos aquoso e etanólico do fruto de *Mimusops elengi* reduziu significativamente a motilidade espermática, o que indicou claramente o potencial espermicida, principalmente, do extrato etanólico (GUPTA, 2014). Resultados semelhantes foram vistos com extrato de *Mentha arvensis*, feito com éter de petróleo (SHARMA e JOCOB, 2001). O efeito da FEFDE sobre a motilidade foi diretamente relacionado à dose, assim como observado com fração rica em flavonoides de *Vitex negundo* (DAS et al., 2004) e saponinas de *Platycodon grandiflorum* (LU et al., 2013). Ainda, segundo Das et al. (2004), fração rica em flavonoides da semente de *Vitex negundo* interfere na função reprodutiva masculina, mas não traz efeitos adversos para outros órgãos.

5. CONCLUSÕES

Fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae), conhecida como “seca-testículo”, foram capazes de alterar o compartimento testicular de camundongos Swiss reduzindo o volume do parênquima testicular, dos túbulos seminíferos e do epitélio seminífero. A FEFDE demonstrou ação mais agressiva sendo capaz de alterar esses parâmetros nas duas maiores concentrações enquanto que o EHADE somente na maior concentração. Embora ambos os extratos tenham causado diminuição da GST, a maior concentração de FEFDE provocou aumento da SOD, o que sugere influência mais efetiva do FEFDE a favor do estresse oxidativo. As alterações provocadas pelos extratos não influenciaram na produção espermática diária, no entanto, interferiram morfofisiologicamente nos espermatozoides como redução da motilidade. Ambos os extratos de *D. elliptica* causaram efeitos negativos para a espermatogênese.

6. REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical Record*, p. 239-247, 1946.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

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

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

AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, v. 45, n. 6, p. 774-781, 1962.

ARABSKI M.; WEGIEREK-CIUK, A.; CZERWONKA, G.; LANKOFF, A.; KACA, W. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 1-6, 2012.

ATSAFACK, S. S.; KUIATE, J. R.; MOUOKEU, R. S.; MOGTOMO, L. K.; TCHINDA, A. T.; DE DIEU, T. J.; NANA, H. M.; ETAME, R. M. E.; BIYITI, L.; NGANE, A. N. Toxicological studies of stem bark extract from *Schefflera barteri* Harms (Araliaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, p. 2-9, 2015.

BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, v. 44, n. 5, 1977.

BHARGAVA, S. K. Antiandrogenic effects of a flavonoid-rich fraction of *Vitex negundo* seeds: a histological and biochemical study in dogs. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 27, p. 327-339, 1989.

BISO, F. I. Avaliação da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas *Davilla nitida* Vahl. e *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae). Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) –Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

BISO, F. I.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; REIS, M. B.; BERNARDI, C. C.; MATTO, J. C. P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; VILEGAS, W.; CÓLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 702 p. 92-99, 2010.

BRASILEIRO FILHO, G. B. Bogliolo, Patologia. 8^o edição. Ed. Guanabara Koogan, 1524p, 2011.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymol*, v. 52, p. 302-310, 1978.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A.; VALÉRIO, H. M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* FR. Allemão. *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 8, n. 2, p. 97-103, 2012.

CASTRO, A. P.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 3, p. 265-269, 2005.

COSTA, K. L. C.; MATTA, S. L. P.; GOMES, M. L. M.; PAULA, T. A. R.; FREITAS, K. M.; CARVALHO, F. A. R.; SILVEIRA, J. A.; DOLDER, H.; MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science*, v. 127, p. 202-212, 2011.

CUEVA, C.; GIL-SÁNCHEZ, I.; AYUDA-DURÁN, B.; GONZÁLES-MANZANO, S.; GONZÁLES-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*, v. 22, p. 1-15, 2017.

DAS, S.; PARVEEN, S.; KUNDRA, C. P.; PEREIRA, B. M. J. Reproduction in Male Rats is Vulnerable to Treatment with the Flavonoid-rich Seed Extracts of *Vitex negundo*. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 8-13, 2004.

DE KRETZER, D. M.; LOVELAND, K. L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N. Spermatogenesis. *Human reproduction*, v. 13, p. 1-8, 1998.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Journal of the American Heart Association*, v. 101, p. 33-39, 2000.

DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.

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

FARNSWORTH, N. R.; WALLER, D. P. Current status of plant products reported to inhibit sperm. *Research Frontiers in Fertility Regulation*, v. 2, n. 1, p. 1-16, 1982.

FRANÇA, L. R.; HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HOFMANN, M. C.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, v. 4, p. 189-212, 2016.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J (Eds). *Male reproduction - a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications. pp. 198-219.

FREITAS, K. M.; COSTA, K. L.; CAMPOS, P. K. A.; MELO, F. C. S. A.; PAULA, T. A. R.; DA MATTA, S. L. P. Effects of Catuaba Cristal® on the testis of Wistar rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, n. 5, p. 901-906, 2011.

GILIO, J. M.; BORELLA, M. I.; CAMARGO, A. C. M.; SILVA, C. A. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. *ConScientiae Saúde*, v. 7, n. 1, p. 69-76, 2008.

GUPTA, P. C. Evaluation of in vitro Spermicidal Potential of *Mimusops elengi* Linn. (Bakul) in Wild Mice. *Indian Journal of Science*, v. 11, n. 27, p. 7-14, 2014.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

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

HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; SMITH, C. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*, v. 73, p. 243-278, 2010.

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

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

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, V. D. C.; OLIVEIRA, M. A. T.; MARIANO, M. C. F.; OLIVEIRA, A. B. Estudo farmacognóstico comparativo das folhas de *Davilla elliptica* A. St.-Hil. e *D. rugosa* Poir., Dilleniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, n. 3, p. 390-396, 2010.

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

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cell of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, v. 203. p. 323-333, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, Z.; WANG, L.; ZHOU, R.; QIU, Y.; YANG, L.; ZHANG, C.; CAI, M.; MI, M.; XU, H. Evaluation of the Spermicidal and Contraceptive Activity of Platycodin D, a Saponin from *Platycodon grandiflorum*. *Plos One*, v. 8, n. 11, p. 1-11, 2013.

MATTA, A. P. L. F. Efeitos do extrato aquoso da raiz de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl. (Ochnaceae) sobre testículos de camundongos suíços adultos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MELLO, F. B. Estudo dos efeitos de *Lantana câmara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos, 2001. In: CASTRO, A. P.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 3, p. 265-269, 2005.

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

MONTEIRO, J. C.; DA MATTA, S. L. P.; PREDES, F. S.; PAULA, T. A. R. Testicular morphology of adult Wistar rats treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. leaf infusion. *Brazilian Archives of Biology Technology*, v. 55, n. 1, p. 101-105, 2012.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

RODRIGUES, C. R.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. *Phytochemical Analysis*, v. 19, p. 17-24, 2008.

ROOSEN-RUNGE E. C.; GIESEL L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *The American Journal of Anatomy*, v. 87, n. 1, p. 1-30, 1950.

ROOSEN-RUNGE E. C. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *The Anatomical Record*, v. 123, n. 4, p. 385-398, 1955.

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

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building the testis. *Tissue and Cell*, v. 27, n. 2, p. 129-147, 1995.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*, v. 81, p. 462-471, 2010.

SHARMA, N.; JOCOB, D. Antifertility investigation and toxicological screening of the petroleum ether extract of the leaves of *Mentha arvensis* L. in male albino mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 75, p. 5-12, 2001.

SHUM, W. W. C.; SILVA, N.; BROWN, D.; BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell–cell crosstalk. *The Journal of Experimental Biology*, v. 212, p. 1753-1761, 2009.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Ed. UFRGS, 6^o Edição. 1903p., 2007.

SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hill. (Dilleniaceae). *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 15, n. 4, p. 352-360, 2005.

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

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.

CAPÍTULO 2: Histomorfometria do compartimento intertubular de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico da folha de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae)

RESUMO

O uso de plantas ditas medicinais tem sido um recurso crescente pela população. Contudo, faz-se necessário estudos para avaliar seus efeitos adversos ou tóxicos. *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae), conhecida como “lixinha” e ainda “seca-testículo”, é utilizada pela população para tratamento de inúmeras doenças, no entanto, é desconhecido seu efeito nos testículos. Objetivou-se avaliar os efeitos da fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e do extrato hidroalcoólico (EHADE) de *D. elliptica* no compartimento intertubular de camundongos Swiss adultos. 48 camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 7 grupos experimentais: G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Calculou-se a proporção volumétrica e volume dos componentes intertubulares, e ainda, realizou-se análises morfométricas e estereológicas das células de Leydig. FEFDE 100mg/Kg provocou aumento de tecido conjuntivo no intertúbulo, e FEFDE 400mg/Kg provocou aumento do núcleo da célula de Leydig. A proporção e volume dos outros componentes não foram alterados, assim como o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo e o índice Leydigossomático. Fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) da folha de *Davilla elliptica* causou alterações intertubulares que podem desencadear perdas no processo espermatogênico. O extrato hidroalcoólico da folha de *Davilla elliptica*, nas doses administradas, não provocou danos numéricos, morfológicos ou morfométricos no compartimento intertubular de camundongos Swiss adultos.

1. INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais para a cura de doenças e alívio de sintomas tem sido praticado desde os primórdios da humanidade, sendo essa prática amplamente utilizada na atualidade como fonte de recurso terapêutico (DI STASI et al., 1996). De acordo com o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011), planta medicinal é definida como espécie vegetal utilizada com propósitos terapêuticos. Contudo, se a intenção é utilizar os fitopreparados como remédios, estes devem ser previamente validados, ter sua ação comprovada e sua toxicidade descrita. Nesse contexto, a prática popular deve ser respaldada em estudos científicos.

Davilla elliptica St.-Hil. é conhecida popularmente como “lixinha” devido a presença de tricomas em suas folhas, o que confere aspereza ao tato. Ainda, é conhecida como “seca-testículo” (comunicação pessoal). Nativa do bioma Cerrado, pertence à família Dilleniaceae, é utilizada pela população como fitopreparado para a cura/prevenção de várias enfermidades, como para tratamento de úlceras gástricas (RODRIGUES et al., 2008), hemorroidas, diarreias, ferimentos (SOARES et al., 2005) e para tratamentos de orquites (BISO et al., 2010). Ainda, como tônica, diurética e sedativa (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). No entanto, poucos estudos descrevem os reais efeitos de *D. elliptica* sobre enfermidades. Foi descrito seu efeito antinociceptivo (AZEVEDO et al., 2007) e antiofídico (NISHIJIMA et al., 2009), e essa ação foi atribuída aos flavonoides. Adicionalmente, o extrato de *D. elliptica* foi capaz de atenuar edemas (NISHIJIMA et al., 2015).

Os testículos exercem funções endócrina e exócrina. É dividido morfofisiologicamente em dois compartimentos: tubular e intertubular. O primeiro é formado pelos túbulos seminíferos, responsáveis pela produção de espermatozoides. O segundo, também chamado de intertúbulo ou interstício, é composto por vasos sanguíneos, sinusoides linfáticos, nervos, células do tecido conjuntivo como fibroblastos e macrófagos e células de Leydig (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

As células de Leydig atuam na produção de andrógenos, em especial, a testosterona, hormônio necessário para a espermatogênese, fertilidade e características sexuais secundárias masculinas. Devido a essa função, as células de Leydig são ricas em gotículas lipídicas em seu citoplasma acompanhadas de enzimas esteroidogênicas (SHARPE et al., 1990; DAVIDOFF et al., 2004; KNOBIL e NEILL, 2006).

D. elliptica é utilizada pela população para o tratamento de inúmeras doenças, porém são escassos os estudos que apresentam os efeitos dessa planta sobre os órgãos, não havendo ainda registro de experimentação científica sobre seu efeito nos testículos. Frente ao vasto uso de *D. elliptica*, fez-se necessário este estudo da morfometria e estereologia das células de Leydig e dos demais componentes do compartimento intertubular de camundongos Swiss adultos após exposição crônica à fração enriquecida em flavonoides e ao extrato hidroalcoólico de *D. elliptica*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos extratos vegetais

Folhas de *Davilla elliptica* foram coletadas no Centro-Oeste do Brasil, região de Cerrado, no município de Jataí-GO e transportadas até a cidade de Viçosa-MG para obtenção dos extratos vegetais. A exsicata de *Davilla elliptica* St.-Hil. foi depositada no herbário Jataiense (Registro HJ 1120) da Universidade Federal de Goiás (UFG) Regional Jataí.

As folhas foram secas em estufa (60°C) e pulverizadas em moinho de faca. A preparação dos extratos da folha de *D. elliptica* foi realizada no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

Quinhentos gramas de folhas secas e pulverizadas de *D. elliptica* foram submetidos à percolação exaustiva com solventes de polaridade crescente. A primeira extração foi feita com solvente apolar para a retirada de óleos, gorduras, esteróis e pigmentos facilitando a extração posterior dos flavonoides. Inicialmente, a droga vegetal foi deixada em maceração por 24h

com 2L de hexano. Foi retirado o percolado obtido. Subsequentemente, a droga vegetal ficou por 24h em maceração com 2L de acetato de etila para obtenção da fração rica em flavonoides (RODRIGUES et al., 2008; SIMÕES, 2007). O percolado obtido foi submetido a concentração no evaporador rotativo a temperatura de 50°C e deixado sob capela. Por fim, foi feita a terceira extração onde a droga vegetal foi deixada em maceração por 24h com 2L de álcool etílico (70%) e o percolado foi submetido a processo anterior descrito.

Os dois extratos de interesse, FEFDE e EHADE, foram retirados da capela quando apresentaram peso constante em três medições com intervalo de 30 minutos cada para ter confirmação da evaporação de todo solvente. Depois, foram depositados em ultrafreezer a temperatura de -80°C e liofilizados. Obteve-se rendimento de 3,83% de fração enriquecida e 20,19% de hidroalcoólico.

2.2 Tratamento

Os procedimentos experimentais seguiram as determinações da Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sendo aprovado sob o protocolo 40/2015.

Foram utilizados 48 camundongos Swiss machos em idade reprodutiva (82 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em regime de temperatura (20°C-22°C) controlada e em fotoperíodo de 12h luz/escuro permanecendo em período de aclimatização por 02 semanas. Foram oferecidas 10g de ração para cada animal diariamente e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais, sendo o controle com 12 animais e os grupos tratados com 6 animais e colocados em gaiolas coletivas. Seis animais receberam apenas água destilada (0,6mL/dia) e seis animais receberam 4% de DMSO (dimetilsulfóxido) em 0,6mL de água destilada (solução veículo). Como esses animais não foram diferentes estatisticamente entre si, foram realocados para o mesmo grupo, resultando no grupo controle (G1) com 12 animais; Grupos 2, 3 e 4 receberam fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) da folha de *D. elliptica* nas concentrações de 100, 200 e 400mg/Kg, respectivamente, diluídos em solução veículo; Grupos 5, 6 e 7 receberam extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de

D. elliptica nas concentrações de 100, 200 e 400mg/Kg, respectivamente, diluídos em 0,6mL de água destilada. Os animais foram pesados semanalmente e as doses ajustadas. Todo o tratamento foi administrado por gavagem e teve duração de 42 dias.

2.3 Coleta de amostras e biometrias corporal e testicular

Depois de 24h da última gavagem, os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se tiopental 30mg/kg, intraperitoneal. A eutanásia foi realizada através de punção cardíaca, sendo o sangue centrifugado e o plasma armazenado para análises posteriores. Em seguida, os testículos foram removidos e aqueles destinados a análises morfométricas foram fixados em solução de Karnovsky. Os testículos foram pesados após fixação em balança de precisão (BEL Mark 160/0,0001g).

Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro.

2.4 Microscopia de luz

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens dos intertúbulos seminíferos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa ImageJ.

2.5 Análise Morfométrica e estereológica do intertúbulo

2.5.1 Proporções volumétricas e volume dos componentes intertubulares

A proporção volumétrica do intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 2660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100X, realizando-se a contagem de 10

campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. A proporção volumétrica intertubular foi calculada, utilizando-se a seguinte equação: $IT(\%) = (NT / NTT) \times 100$, onde NT= Registro do número de pontos sobre o intertúbulo e NTT= Número total de pontos contados.

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, realizando-se a contagem de campos aleatoriamente distribuídos, nas preparações histológicas do testículo de cada animal.

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

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

2.5.2 Diâmetro nuclear, volume nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo

Foi medido o diâmetro nuclear médio, em μm , das células de Leydig em aumento de 400x, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram mais esféricos e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir das fórmulas abaixo, foram calculados então o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig (VL), em μm^3 : $VNL = 4/3 \pi R^3$, onde R= Raio nuclear. $VCL = \%CL \times VNL / \%NL$, onde %CL= Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig e %NL = Proporção volumétrica de núcleo de Leydig. $VL = VNL + VCL$.

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

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

2.5.3 Índice Leydigossomático

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

2.6 Análises estatísticas

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

3. Resultados

3.1 Biometria corporal e testicular

Os dados biométricos corporal e testicular encontram-se dispostos na Tabela 1. Os grupos G6 e G7 tiveram diminuição do peso corporal em

14,94% e 17,13%, respectivamente, comparados com o controle. O peso testicular não diferiu com o tratamento. O peso do parênquima testicular diminuiu nos grupos 3, 4 e 7, em 20%, 30% e 20%, respectivamente, em relação ao controle. Quanto ao peso da albugínea, apresentou aumento nos grupos 4, 6 e 7 de 100%, 50% e 100%, respectivamente, em relação ao controle.

Tabela 1. Parâmetros biométricos corporal e testicular de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	PC (g)	PT (g)	PPT (g)	PA (g)
G1	43,44±3,84 ^a	0,12±0,02 ^a	0,10±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a
G2	46,04±4,39 ^a	0,13±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	0,02±0,00 ^a
G3	40,67±3,32 ^a	0,10±0,02 ^a	0,08±0,02 ^b	0,02±0,00 ^a
G4	39,30±2,39 ^a	0,11±0,01 ^a	0,07±0,01 ^b	0,04±0,00 ^b
G5	39,43±3,62 ^a	0,12±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a
G6	36,95±4,65 ^b	0,12±0,02 ^a	0,08±0,02 ^a	0,03±0,01 ^b
G7	36,00±3,21 ^b	0,11±0,01 ^a	0,08±0,01 ^b	0,04±0,00 ^b

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. PC- Peso corporal; PT- Peso testicular; PPT- Peso do parênquima testicular; PA- Peso da albugínea. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle (p≤0,05).

3.2 Morfometria e estereologia do intertúbulo

Estão apresentados na Tabela 2 a proporção volumétrica e volume de intertúbulo e o índice Leydigossomático. Esses três parâmetros analisados não foram influenciados pelo tratamento.

Tabela 2. Proporção volumétrica (IT) e volume (VIT) de intertúbulo e índice Leydigossomático (ILS) de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

Grupos	IT (%)	VIT (μ L)	ILS (%)
G1	8,22 \pm 1,35 ^a	8,03 \pm 1,42 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a
G2	9,03 \pm 0,70 ^a	10,01 \pm 1,65 ^a	0,03 \pm 0,00 ^a
G3	10,53 \pm 2,44 ^a	10,53 \pm 2,44 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a
G4	10,72 \pm 1,98 ^a	8,22 \pm 2,58 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a
G5	9,64 \pm 2,05 ^a	9,42 \pm 2,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a
G6	10,02 \pm 1,92 ^a	8,38 \pm 1,78 ^a	0,03 \pm 0,00 ^a
G7	9,87 \pm 2,07 ^a	7,33 \pm 1,29 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

A proporção volumétrica dos componentes intertubulares está demonstrada na Tabela 3. A proporção volumétrica de núcleo e citoplasma de Leydig, célula de Leydig, vaso sanguíneo e espaço linfático não diferiram do controle estatisticamente. Entretanto, a proporção volumétrica de tecido conjuntivo aumentou em G2 em 77,5% em relação ao controle.

Tabela 3. Proporção volumétrica dos componentes intertubulares de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

G	NL (%)	CL (%)	Ley (%)	VS (%)	EL (%)	TC (%)
G1	0,92±0,13 ^a	5,48±1,13 ^a	6,40±1,22 ^a	1,08±0,49 ^a	0,69±0,38 ^a	0,04±0,02 ^a
G2	0,92±0,19 ^a	6,25±0,85 ^a	7,18±0,79 ^a	1,38±0,66 ^a	0,38±0,20 ^a	0,09±0,02 ^b
G3	1,08±0,29 ^a	7,25±2,29 ^a	8,32±2,53 ^a	1,47±0,23 ^a	0,69±0,36 ^a	0,05±0,02 ^a
G4	1,16±0,42 ^a	6,66±1,47 ^a	7,82±1,89 ^a	2,14±0,90 ^a	0,72±0,70 ^a	0,04±0,02 ^a
G5	1,17±0,47 ^a	6,14±1,74 ^a	7,31±2,15 ^a	1,68±0,51 ^a	0,59±0,34 ^a	0,05±0,02 ^a
G6	1,29±0,35 ^a	6,25±1,18 ^a	7,53±1,25 ^a	1,76±1,14 ^a	0,71±0,23 ^a	0,02±0,02 ^a
G7	1,19±0,33 ^a	5,99±1,29 ^a	7,18±1,58 ^a	1,94±0,61 ^a	0,71±0,38 ^a	0,03±0,01 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. G- Grupos; Proporção volumétrica de núcleo de Leydig (NL), citoplasma de Leydig (CL), célula de Leydig (Ley), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL) e tecido conjuntivo (TC). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle (p≤0,05).

Os valores de volume dos componentes do intertúbulo por testículo estão apresentados na Tabela 4. O volume nuclear e citoplasmático de Leydig, volume de vaso sanguíneo e espaço linfático não diferiram estatisticamente com o grupo controle. O volume de tecido conjuntivo em G2 aumentou 150% em relação ao controle.

Tabela 4. Volume dos componentes intertubulares por testículo de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

G	VNL (μL)	VCL (μL)	VVS (μL)	VEL (μL)	VTC (μL)
G1	0,90±0,15 ^a	5,37±1,22 ^a	1,05±0,47 ^a	0,66±0,36 ^a	0,04±0,02 ^a
G2	1,01±0,15 ^a	6,98±1,58 ^a	1,50±0,66 ^a	0,42±0,23 ^a	0,10±0,03 ^b
G3	0,84±0,29 ^a	5,67±2,25 ^a	1,15±0,32 ^a	0,51±0,24 ^a	0,04±0,02 ^a
G4	0,82±0,27 ^a	4,72±0,94 ^a	1,46±0,39 ^a	0,54±0,55 ^a	0,03±0,02 ^a
G5	1,16±0,54 ^a	6,00±1,65 ^a	1,64±0,54 ^a	0,56±0,27 ^a	0,05±0,02 ^a
G6	1,06±0,26 ^a	5,26±1,35 ^a	1,43±0,88 ^a	0,61±0,24 ^a	0,02±0,02 ^a
G7	0,89±0,23 ^a	4,46±0,84 ^a	1,43±0,36 ^a	0,54±0,31 ^a	0,02±0,01 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. G- Grupos; Volume de núcleo de Leydig (VNL), citoplasma de Leydig (VCL), vaso sanguíneo (VVS), espaço linfático (VEL) e tecido conjuntivo (VTC). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle (p≤0,05).

Diâmetro nuclear de Leydig, volume nuclear, citoplasmático e de Leydig estão expostos na Tabela 5. O G4 teve aumento do diâmetro nuclear de Leydig de 12,47% e do volume nuclear de Leydig de 41,61% em relação ao controle. O volume citoplasmático e celular de Leydig não diferiram significativamente quando comparados com o controle.

Tabela 5. Diâmetro nuclear de Leydig (DN), volume nuclear de Leydig (VNL), volume citoplasmático de Leydig (VCL) e volume da célula de Leydig (VL) de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

G	DN (µm)	VNL (µm³)	VCL (µm³)	VL (µm³)
G1	8,42±0,41 ^a	314,17±45,08 ^a	1904,68±511,84 ^a	2218,85±552,24 ^a
G2	9,07±0,32 ^a	392,32±41,26 ^a	2718,53±558,78 ^a	3110,84±556,69 ^a
G3	8,86±1,08 ^a	377,56±129,19 ^a	2565,28±1086,95 ^a	2942,84±1208,32 ^a
G4	9,47±0,10 ^b	444,90±14,13 ^b	2655,71±437,59 ^a	3100,61±449,61 ^a
G5	9,21±0,32 ^a	410,07±44,14 ^a	2256,19±413,07 ^a	2666,26±416,16 ^a
G6	8,86±0,66 ^a	368,43±84,01 ^a	1985,95±1012,26 ^a	2354,38±1093,75 ^a
G7	9,08±0,31 ^a	392,80±39,31 ^a	2010,90±321,06 ^a	2403,70±346,02 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. G- Grupos. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle (p≤0,05).

O volume e o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo está apresentado na Tabela 6. Não foram observadas alterações nestes parâmetros com os tratamentos utilizados.

Tabela 6. Volume de células de Leydig por testículo (VLT) e por grama de testículo (VL/gT), número de células de Leydig por testículo (NL) e por grama de testículo (NL/gT) de camundongos Swiss expostos à fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e ao extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*.

G	VLT (μL)	VL/gT (μL)	NL*10⁶	NL/gT*10⁶
G1	6,27±1,33 ^a	64,04±12,17 ^a	2,89±0,53 ^a	24,14±4,42 ^a
G2	7,99±1,60 ^a	71,75±7,92 ^a	2,59±0,39 ^a	20,00±3,25 ^a
G3	6,52±2,51 ^a	83,23±25,35 ^a	2,33±0,69 ^a	22,98±4,67 ^a
G4	5,54±1,20 ^a	78,21±18,88 ^a	1,85±0,64 ^a	16,84±6,08 ^a
G5	7,16±2,14 ^a	73,10±21,48 ^a	2,79±1,14 ^a	22,50±8,04 ^a
G6	6,33±1,40 ^a	75,34±12,50 ^a	3,05±1,17 ^a	26,76±10,20 ^a
G7	5,34±1,03 ^a	71,83±15,75 ^a	2,27±0,63 ^a	20,34±6,19 ^a

G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. G- Grupos. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença dos grupos tratados com o controle ($p \leq 0,05$).

Pode ser visto na Figura 1 o parênquima intertubular e seus elementos de camundongos Swiss tratados com FEFDE e EHADE.

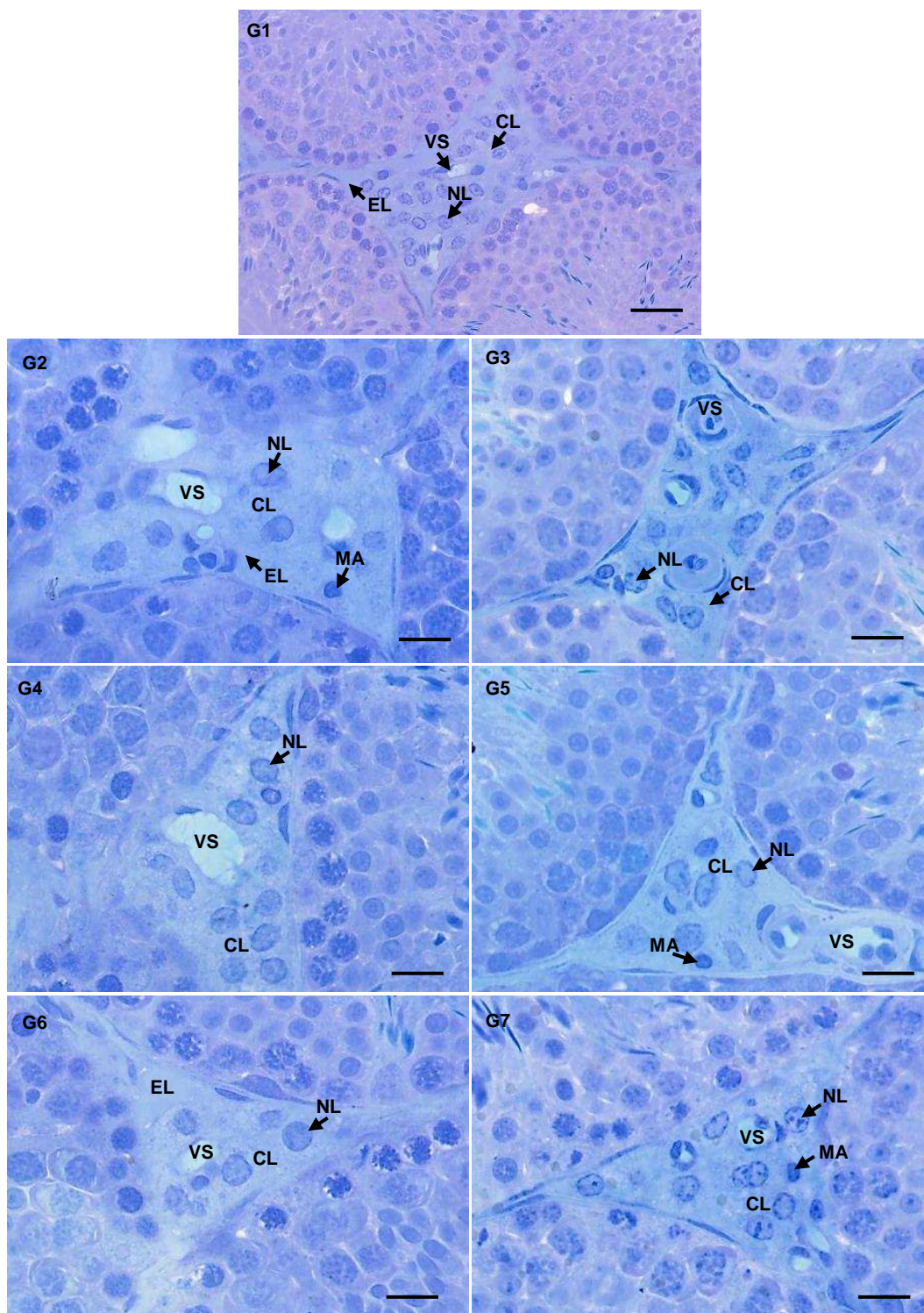


Figura 1. Fotomicrografias do parênquima testicular de camundongos Swiss tratados com fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *D. elliptica*. G1- Controle; G2- FEFDE 100mg/Kg; G3- FEFDE 200mg/Kg; G4- FEFDE 400mg/Kg; G5- EHADE 100mg/Kg; G6- EHADE 200mg/Kg; G7- EHADE 400mg/Kg. NL- Núcleo de Leydig; CL- Citoplasma de Leydig; VS- Vaso sanguíneo; EL- Espaço linfático; MA- Macrófago. Coloração: azul de toluidina/borato de sódio 1%. Barras: G1 = 20 μ m; G2 a G7 = 10 μ m.

4. DISCUSSÃO

A diminuição do peso corporal, vista em G6 e G7, indica influência do EHADE nesse parâmetro, embora essa alteração não seja indício de toxicidade sistêmica, pois não foram observadas alterações comportamentais ao longo do tratamento, e a massa corporal dos animais estava dentro do intervalo de peso normal para a espécie (NEVES, 2013). Resultados semelhantes, com diminuição do peso corporal e diagnóstico de normalidade, podem ser verificados em Freitas et al. (2011). O peso testicular foi mantido porque mesmo com a diminuição do peso do parênquima, de maneira compensatória, as maiores concentrações testadas dos dois extratos aumentaram o peso da albugínea.

Em ratos, cerca de 10% do parênquima testicular é ocupado por tecido intertubular (RUSSELL e FRANÇA, 1995) e neste trabalho, tanto FEFDE quanto EHADE não influenciaram essa proporção. A proporção e o volume dos componentes intertubulares mantiveram-se inalterados com o tratamento, exceto a proporção e o volume de tecido conjuntivo que foi aumentada em G2. Sugere-se que o aumento do tecido conjuntivo, após exposição a algum xenobiótico, pode afetar o movimento de fluidos e hormônios na comunicação parácrina entre células de Leydig e os túbulos seminíferos (NEVES, 2016), sendo que a menor concentração de FEFDE foi capaz de provocar tal alteração.

O volume da célula de Leydig no testículo não foi alterado com os tratamentos, pois mesmo com o aumento do diâmetro e volume nuclear de Leydig em G4, o volume citoplasmático se manteve inalterado. Ohta et al. (2016) observaram que o extrato hidroalcoólico de *Lepidium meyenii* aumentou a capacidade esteroideogênica das células de Leydig, com manutenção do volume nuclear e aumento da área citoplasmática. O índice Leydigossomático não foi influenciado pelo tratamento, bem como o volume e o número de Leydig por testículo e por grama de testículo. Extrato aquoso de *Taraxacum officinale* causou diminuição no número de células de Leydig, e conseqüente, diminuição de testosterona (TAHTAMOUNI et al., 2016). Em oposição, estudo feito com óleo essencial de *Satureja khuzestanica* demonstrou que esse metabólito secundário pareceu benéfico para a fertilidade de ratos machos, com aumento

do número das células de Leydig (HAERI et al., 2006). Como o número da célula de Leydig não modificou com o tratamento utilizado neste estudo, pode-se aferir, embasados em Haeri et al. (2006) e Tahtamouni et al. (2016), que a fertilidade não foi afetada no que envolve esse parâmetro.

Castro et al., (2002) propõe que há correlação direta do número das células de Leydig por grama de testículo com os níveis plasmáticos e testiculares de testosterona. Tahtamouni et al. (2016) atribuem a redução do peso do testículo com a redução dos níveis de testosterona. Com base na relação estabelecida por Castro et al. (2002) e Tahtamouni et al. (2016) e com os resultados obtidos como manutenção significativa do volume do citoplasma de Leydig, do número das células de Leydig e massa testicular, pode-se sugerir que as concentrações sérica e testicular de testosterona não sofreram alteração com o tratamento.

5. CONCLUSÕES

Fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) da folha de *Davilla elliptica* causou alterações intertubulares que podem desencadear perdas no processo espermatogênico. O extrato hidroalcoólico não provocou danos numéricos, morfológicos ou morfométricos no compartimento intertubular de camundongos Swiss adultos, independente da dose.

6. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de fitoterápicos farmacopeia brasileira. Anvisa. 1º edição. Brasília-DF, 2011.

AZEVEDO, A. O.; CAMPOS, J. J.; GALDINO, G. S.; BRAGA, F. C.; DUARTE, I. D. G.; PEREZ, A. C. Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 354–356, 2007.

BISO, F. I.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; REIS, M. B.; BERNARDI, C. C.; MATTO, J. C. P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; VILEGAS, W.; CÓLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 702 p. 92-99, 2010.

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

DAVIDOFF, M. S.; MIDDENDORFF, R.; ENIKOLOPOV, G.; RIETHMACHER, D.; HOLSTEIN, A. F.; MULLER, D. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *The Journal of Cell Biology*, v. 167, n. 5, p. 335-944, 2004.

DI STASI, L. C. Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230 p. In ROSSATO, A. E. et al. Fitoterapia racional: Aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos, v. 1. 1º Edição. Florianópolis-SC, 216p., 2012.

FREITAS, K. M.; COSTA, K. L.; CAMPOS, P. K. A.; MELO, F. C. S. A.; PAULA, T. A. R.; DA MATTA, S. L. P. Effects of Catuaba Cristal® on the testis of Wistar rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, n. 5, p. 901-906, 2011.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Cap. 21 Aparelho reprodutor masculino. 12ª edição. Ed. Guanabara Koogan, p. 411-426, 2013.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *Physiology of reproduction*. Ed. Academic Press. 3ª edition, 3190p., 2006.

NEVES, A. C. Efeitos do açaí (*Euterpe edulis*) em testículo de ratos expostos ao acetato de chumbo: análise morfométrica e estrutural. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) –Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

NISHIJIMA, C. M.; DELELLA, F. K.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; LOPES-FERREIRA, M. V. A. The Anti-Inflammatory Effects of the Methanolic Extract and Fractions from *Davilla elliptica* St. Hil. (Dilleniaceae) on *Bothrops jararaca* Envenomation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 12454-12466, 2015.

NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. *Molecules*, v. 14, p. 1072-1080, 2009.

OHTA, Y.; YOSHIDA, K.; KAWATE, N.; TAKAHASHI, M.; INABA, T.; HATOYA, S.; MORII, H.; TAKASHI, K.; ITO, M.; OGAWA, H.; TAMADA, H. Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) increases serum testosterone concentration and enhances steroidogenic ability of Leydig cells in male rats. *First International Journal of Andrology*, v. 48, p. 347-354, 2016.

RODRIGUES, C. R.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. *Phytochemical Analysis*, v. 19, p. 17-24, 2008.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande –Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building the testis. *Tissue and Cell*, v. 27, n. 2, p. 129-147, 1995.

SHARPE, R. M.; MADDOCKS, S.; KERR, J. B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *The American Journal of Anatomy*, v. 188, p. 3-20, 1990.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Ed. UFRGS, 6ª Edição. 1903p., 2007.

SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hill. (Dilleniaceae). *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 15, n. 4, p. 352-360, 2005.

TAHTAMOUNI, L. H.; AL-KHATEEB, R. A.; ABDELLATIF, R. N.; AL-MAZAYDEH, Z. A.; YASIN, S. R.; AL-GHARABLI, S.; ELKARMI, A. Z. Anti-spermatogenic activities of *Taraxacum officinale* whole plant and leaves aqueous extracts. Veterinary Research Forum, v. 7, n. 2, p. 89- 97, 2016.

CONCLUSÕES GERAIS

Fração enriquecida em flavonoides (FEFDE) e extrato hidroalcoólico (EHADE) da folha de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae), conhecida como “seca-testículo”, desencadearam alterações histopatológicas no testículo de camundongos Swiss que podem refletir negativamente na espermatogênese. A FEFDE demonstrou ação mais agressiva, pois foi capaz de desencadear tais alterações em concentrações mais baixas que o EHADE.