

Tatiana Montanari

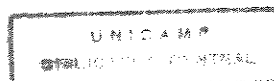
SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

EFETO DE *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. E
MAYTENUS ILICIFOLIA Mart. ex Reiss SOBRE A
ESPERMATOGÊNESE DE CAMUNDONGO
COMO MODELO EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Biologia Celular.
Orientadora: Profª Mary Anne Heidi
Dolder

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Tatiana Montanari
H. Dolder 16
e aprovada pela Comissão Julgadora. 09
94

Campinas, SP
Instituto de Biologia da UNICAMP
1994



**A João Antônio Porto e
Alexandre Eckert**

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dr^a Mary Anne Heidi Dolder pela orientação e amizade;

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, coordenador da área de Ensaios Biológicos do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, pela co-orientação;

Ao Eng^o. Agron. Pedro Melillo de Magalhães, coordenador da área de Agrotecnologia do CPQBA, e ao Sr. Albano Ferreira Martins pelo fornecimento das plantas medicinais;

À química Mary Anne Foglio, supervisora do laboratório de Análises Fitoquímicas do CPQBA, bem como a todos os integrantes deste laboratório pela ajuda no preparo do extrato das plantas;

Ao Departamento de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas e à bióloga Sandra Maria Mansur Scagliusi pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão e pela revelação dos filmes aí tirados;

Ao Instituto de Química e ao Prof. Dr. Fernando Galembeck pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão, e a Renato Massami Sasaki por toda a ajuda.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, em nome da Prof^a Dr^a Maria Alice da Cruz Hofling, pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão, e às técnicas Antônio Maria Ferreira Lima e Adriane Cristina Sarti Sprogis pela realização de cortes ultrafinos com a navalha de diamante;

Aos meus colegas veteranos de Microscopia Eletrônica: professores José Lino Neto, Cristiana de Noronha Begnami e Christiane Bertachini pela ajuda;

Ao Departamento de Anatomia, em nome de seu chefe Prof. Dr. Francesco Langoni, e aos técnicos Marco Aurélio Ribeiro de Paula e Norivaldo Celestino por terem possibilitado as condições para a obtenção dos cortes histológicos;

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares do Departamento de Parasitologia pela orientação na análise estatística;

Ao Prof. Dr. Ernesto D'Ottaviano do Departamento de Fisiologia, à Prof^a. Dr^a Márcia Regina Fernandes Boaro Martins do Departamento de Anatomia e ao Prof. Dr. Urbano M. Ferraz Meirelles do Departamento de Farmacologia da UNICAMP e ao Prof. Dr. Galba E.S. Moraes do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS pela leitura da tese e pelas sugestões realizadas;

Ao Prof. Dr. Édson Rosa Pimentel, à Prof^a. Dr^a Maria Luíza Mello e à Prof^a. Dr^a Shirlei Recco-Pimentel do Departamento de Biologia Celular pelos esclarecimentos, pelas sugestões

que fizeram e, principalmente, pelo carinho com que me trataram;

Ao Dr. Francisco Angelo Malattesta, técnico do Departamento de Biologia Celular, pela ajuda no preparo das soluções;

Aos secretários do Departamento de Biologia Celular Maria Aparecida da Cunha, Líliam Alves Senne Panagio e Sidnei Henrique Simões pelos préstimos e pelo carinho;

À Prof^a. Ilva F. Varaschini pela revisão do português;

À minha família, à família do Dr. Rubens L. Sgambatti, à Sandra, à Mara, à Marlise e ao Xandi pelo apoio e pelo resto, que de resto nada teve, foi tudo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

"(...) porque estamos tentando a cada momento que a juventude estudiosa una, ao saber que conseguiu nas aulas, o entusiasmo criador do povo inteiro da república, e se incorpore ao grande exército daqueles que fazem, deixando de lado esta pequena patrulha daqueles que somente dizem."

Che Guevara

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	p.1
Considerações sobre o Testículo e a Espermatogênese	p.2
1. Espermatogênese	p.2
2. Espermição	p.5
3. Barreira Testicular	p.5
4. Alterações na Espermatogênese	p.6
5. Ultra-estrutura do Espermatozóide	p.7
Substâncias que Afetam a Espermatogênese	p.8
1. Agentes Farmacológicos	p.8
1.1 Alfa-cloridrina e derivados	p.8
1.2 Acetato de Ciproterona e compostos derivados	p.9
1.3 Bis-dicloro-acetil diaminas	p.10
1.4 5-Tio-D-Glicose	p.11
1.5 Pipecolinometil 1,5 - Hidroxiindano	p.11
2. Hormônios Esteróides	p.12
3. Análogos de LHRH	p.14
4. Plantas e Substâncias isoladas de plantas	p.15
4.1 Gossipol	p.15
4.2 <i>Trypterygium wilfordii</i> Hook	p.16
4.3 Embelin	p.17
4.4 <i>Hibiscus rosa sinensis</i> Burm.	p.17
4.5 <i>Malvaviscus conzatii</i> Greenm	p.18
4.6 <i>Dieffenbachia seguine</i> (Jacq.) Schott	p.18
4.7 <i>Polygonum hydropiper</i> L.	p.19
Considerações sobre as Plantas Utilizadas	p.20
1. <i>Achillea millefolium</i> L.	p.20
2. <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.ex Reiss	p.21
Objetivos	p.23
MATERIAL E MÉTODOS	p.24
1. Animais	p.24
2. Material Vegetal e Extração	p.24
3. Procedimento	p.25
Experimento 1	p.25
Experimento 2	p.25
Experimento 3	p.26
Experimento 4	p.26

4. Análise Estatística	p.26
RESULTADOS	p.27
1. Experimento 1: <i>M.ilicifolia</i> , 200 mg/kg/dia, 20 dias	p.27
2. Experimento 2: <i>A.millefolium</i> , 200 mg/kg/dia, 20 dias	p.36
3. Experimento 3: <i>M.ilicifolia</i> , 800 mg/kg/dia, 30 dias	p.48
4. Experimento 4: <i>A.millefolium</i> , 300 mg/kg/dia, 30 dias	p.58
5. Estudo Prévio da Histologia dos Órgãos Reprodutores	p.66
DISCUSSÃO	p.70
CONCLUSÃO	p.80
RESUMO	p.81
ABSTRACT	p.82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p.83

INTRODUÇÃO

As investigações científicas para desenvolvimento de um método sistemático de contracepção masculina tiveram início nos anos 50, através da observação dos efeitos de diversas substâncias químicas sobre a espermatogênese (144). Os primeiros compostos analisados foram os nitrofuranos, que são clinicamente usados como bacteriostáticos (145). Eles revelaram-se eficazes em interromper a produção de espermatozóides no homem, mas em doses que provocaram náusea e dor de cabeça (143). De uma forma geral, as drogas testadas não alcançaram o objetivo por causa da baixa atividade sobre a espermatogênese e também da toxicidade. Entretanto, destas substâncias, muitas, como os compostos mencionados, forneceram resultados que mereceriam uma reavaliação ou a síntese de análogos menos tóxicos (183).

A utilização de hormônios esteróides com o objetivo de suprimir a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), num mecanismo semelhante ao da contracepção feminina, foi outra área bastante investigada (181,183). Entretanto a dificuldade em acertar a dose ideal para suprimir a espermatogênese, o problema do "rebound" (rebote), que é o aumento na produção de espermatozóides após o período de inibição, e a necessidade de uma fonte de testosterona exógena para evitar a impotência ainda impossibilitam que este método seja usado com segurança.

Outro enfoque da contracepção masculina é o uso de análogos químicos do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH). Esses análogos interferem com a ação do LHRH, um peptídeo sintetizado no hipotálamo que estimula a liberação do FSH e do LH (160).

São intensas as investigações sobre o efeito de extratos vegetais e princípios ativos isolados na reprodução. O gossipol é o princípio ativo mais estudado e que apresenta melhores resultados (83,141,149). Apesar de não ser ideal para a "pílula masculina", forneceu vários espermicidas e certamente contribuiu para aumentar o conhecimento da bioquímica do espermatozóide e das células do trato reprodutor. Atualmente estudos com o *Trypterigium wilfordii* Hook são muito promissores para um contraceptivo masculino (164,165). Entretanto outras espécies vegetais, de maneira mais modesta, estão sendo investigadas.

Na literatura, revisões de plantas usadas por diversos povos, principalmente indígenas, são abundantes. Nomes de espécies se repetem, principalmente quando se tratam de contraceptivos femininos e abortivos. Entretanto algumas são referidas como tendo sido usadas pelo homem, como por exemplo, a *Dieffenbachia seguine* (Jacq.) Schott (158).

Neste trabalho, duas espécies de plantas que são utilizadas para regular a fertilidade feminina (6,7,35,48) serão testadas em camundongos para verificar seu possível efeito na espermatogênese, a exemplo de outros trabalhos (95,102). Estas plantas, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss ("espinheira-santa") e *Achillea millefolium* L. ("milfolhas"), são medicinais e de uso popular no Brasil, com várias indicações, muitas delas com base científica (31,35).

A seguir tem-se algumas considerações sobre o testículo e o espermatozóide, em especial sobre a espermatogênese, uma revisão das principais drogas e plantas estudadas para a contracepção masculina e observações gerais sobre as espécies utilizadas neste trabalho.

CONSIDERAÇÕES SOBRE O TESTÍCULO E O ESPERMATOZÓIDE

1. ESPERMATOGENESE

A espermatogênese é o processo no qual a espermatogônia, uma célula germinativa diplóide e não diferenciada, transforma-se no espermatozóide, a célula germinativa haplóide e especializada em fertilizar o gameta feminino. Entre a espermatogônia e o espermatozóide, a célula germinativa apresenta características específicas e recebe outras denominações. As células espermatogênicas, segundo a sua diferenciação, são denominadas espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermatídes e espermatozóides (133).

A espermatogênese divide-se em três fases principais: a spermatocitogênese, onde as espermatogônias proliferam por mitose, originando as várias gerações de espermatogônias e os espermatócitos primários; a meiose, onde os espermatócitos sofrem duas divisões de maturação, reduzindo os cromossomos pela metade, produzindo as espermatídes; e a espermiogênese, onde a espermatíde, que é uma célula ovóide, sofre notáveis transformações até a formação de uma célula alongada e com flagelo, o espermatozóide (133).

A espermatogênese, no camundongo, dura 34,5 dias e é dividida em 12 estágios e 4 ciclos do epitélio seminífero (147). Os estágios representam associações celulares bem definidas nos túbulos seminíferos. Estes estágios são demarcados especialmente pelo desenvolvimento das espermatídes, com mudanças ao nível do núcleo e do acrossomo. Os vários estágios da espermiogênese estão sempre associados com os mesmos estágios da espermatogênese e, assim, os estágios bem definidos da espermiogênese são usados para classificar os eventos da espermatogênese (113). Entretanto a espermiogênese do camundongo é dividida em 16 estágios e somente os 12 primeiros correspondem a um ciclo do epitélio seminífero (146).

O ciclo do epitélio seminífero é definido como uma série de mudanças que ocorrem numa dada área deste epitélio, entre o surgimento sucessivo da mesma associação celular. Então, por exemplo, um ciclo começa com a formação das espermatídes e termina quando a próxima geração das espermatídes aparece na mesma área (112,113).

Os estágios da espermiogênese são enumerados por números arábicos, enquanto os do ciclo do epitélio seminífero, por números romanos (112).

O túbulo seminífero no estágio I do ciclo inclui, entre outras células, espermatídes no estágio 1 da espermiogênese; no estágio II, espermatídes no estágio 2 e assim por diante (113). Entretanto, como mencionado anteriormente, a espermiogênese requer mais do que um ciclo para se completar, e os estágios 1 a 8 das espermatídes desenvolvem-se sobrepostos a estágios 13 a 16 (146).

A espermiogênese é dividida também em 4 fases (112,113):

- fase de Golgi, onde há o surgimento de grânulos PAS positivos (indicando a presença de glicoproteínas) no idiossoma, um corpo central na zona de Golgi. Os grânulos se fundem em um único grânulo acrossômico;
- fase de capuz, onde o grânulo acrossômico achata-se sobre o núcleo e forma o capuz acrossômico;
- fase de acrossoma, que inclui o desenvolvimento do acrossoma, a condensação do nucleoplasma e o alongamento da espermátide;
- fase de maturação, que leva à formação do espermatozóide livre.

Detalhes sobre estas fases, bem como sobre os estágios da espermiogênese e da espermatogênese do camundongo são dadas por OAKBERG (146). Há um maior número de informações sobre o ciclo do epitélio seminífero de rato (80,112,113), do que sobre o de camundongo, mas essas não podem ser aproveitadas integralmente já que a duração e o número de estágios diferem. A espermatogênese do rato dura de 48 a 53 dias (37) e é dividida em 14 estágios (112). A espermiogênese, por sua vez, foi dividida em 19 estágios (112).

Brevemente a espermatogênese do camundongo pode ser assim descrita:

As espermatogônias denominadas do tipo A (que possuem núcleo interfásico com uma cromatina finamente granulada) aumentam em número por uma série de divisões mitóticas, provavelmente 3 (A1 dá origem à A2, que origina A3 e que, por sua vez, origina A4). Nos túbulos em estágios II e III, a maioria das espermatogônias do tipo A transformam-se em espermatogônias do tipo intermediário. Umas poucas, entretanto, tornam-se dormentes e somente iniciam um novo ciclo de multiplicação de espermatogônias pela divisão mitótica no estágio IX. Paralelamente a estas espermatogônias, permanece, nos túbulos seminíferos, um tipo de célula que raramente se divide e que por isso atuaria como reserva. Estas são referidas como tipo A0. As espermatogônias A1 iniciam a mitose com a regularidade de um relógio, em intervalos fixos, que é, por exemplo, de 12 dias no rato e de 16 dias no homem. As espermatogônias do tipo intermediário dividem-se no estágio IV para formar espermatogônias do tipo B (que possuem núcleo com massas de cromatina intensamente coradas, adjacentes ao envoltório nuclear). Estas, por sua vez, dividem-se no estágio VI, originando os espermátócitos primários (38,69,146).

Assim, os espermátócitos primários são produto da mitose da quinta geração de espermatogônias. Eles sofrem a primeira divisão meiótica e derivam os espermátócitos secundários que sofrem a segunda divisão meiótica e originam as espermátides (152).

A duração das diversas etapas da espermatogênese de camundongo foi estimada (146):

- espermátogônia tipo A - sempre presente;
- espermátogônia tipo intermediário - 27,3 h;
- espermátogônia tipo B - 29,4 h;
- espermátócito primário pré-leptóteno - 31 h:
 - leptóteno - 31,2 h;
 - zigóteno - 37,5 h;
 - paquíteno - 175,3 h;
 - diplóteno - 21,4 h;

diacinese + metáfase I - 10,4 h;
 espermátocito secundário - 10,4 h;
 espermátide - 229,2 h.

Estudos com raio X, tanto em camundongos, como em ratos, mostraram que nenhum espermatozóide permanece no túbulo seminífero, após 27 ou 28 dias da irradiação. Esta duração representa o tempo necessário para o espermatozóide ser produzido a partir dos espermátocitos primários, já que, com a irradiação, a fonte de espermatogônias foi lesada (146).

Os picos de mitose são três: o primeiro ocorre no estágio IX, o segundo, no estágio XI e o terceiro, nos estágios I e II. Pelo fato da metáfase e da anáfase ocorrerem rapidamente, células nestas etapas da divisão celular estão em frequência muito baixa nos túbulos seminíferos e restritas aos estágios X, XII e III (146).

Parece que a transformação da espermatogônia do tipo A para aquela do tipo intermediário é um estágio crítico que, algumas vezes, origina numerosas formas degenerativas. A espermatogônia do tipo B, ao contrário, parece ser particularmente resistente a fatores que perturbam a espermatogênese (152).

Em camundongos normais, nos túbulos seminíferos de estágios IX a II, ao longo da membrana basal, observam-se muitas células necróticas que são originadas principalmente de espermatogônias do tipo A. Os picos de degeneração são intimamente associados aos picos mitóticos das células do tipo A e parecem resultar de interrupção na meiose. Necrose de espermatogônias do tipo intermediário e do tipo B também ocorrem, mas com menor frequência. Numerosos espermátocitos necróticos ocorrem durante a meiose, mas não há perda de espermátocitos durante a prófase. A perda celular durante a meiose é o fator primário responsável pela discrepância entre o número esperado e o número observado de espermátides. O número de espermátides no estágio II é de somente 87% daquele esperado com base no número de espermátocitos primários. Há ainda uma pequena quantidade de degeneração nos estágios iniciais da espermiogênese. Muitas células em degeneração ocorrem nos túbulos no estágio XII. A degeneração de células durante a espermatogênese deve ser uma seleção contra aberrações cromossômicas. Células degeneradas na meiose frequentemente mostram os cromossomos agrupados na placa metafásica, mas anáfases atípicas mostrando vários tipos de anormalidades citogenéticas também podem ocorrer. (146).

Uma alta proporção de cada geração de espermatogônias do tipo A é multinucleada. Tais células sofrem meiose e desenvolvimento pós-meiótico normais e dão surgimento a espermatozóides típicos (25). Espermátides multinucleadas também são componentes do epitélio seminífero de camundongos normais. Em muitas destas células, os núcleos sofrem a sequência normal de transformação vista em células uninucleadas e dão surgimento a espermatozóides individuais. Entretanto, em outras cujos núcleos estão muito próximos, um único complexo de Golgi pode servir a ambos e dar surgimento a um único acrossomo em forma de T ou então uma única manchete pode envolver os dois núcleos (pares de axonemas dentro de uma mesma membrana plasmática foram encontrados) e assim tem-se um espermatozóide com duas cabeças e um flagelo comum (26).

2. ESPERMIAÇÃO

O processo de liberação dos espermatozóides para a luz dos túbulos seminíferos, denominado de espermição, parece envolver movimentos ativos complexos da região apical da célula de Sertoli, onde as espermatídes estão inseridas. Estes movimentos devem depender de filamentos citoplasmáticos pequenos, como actina, e, possivelmente, de fluxo citoplasmático dirigido ao longo dos microtúbulos (62).

A espermição deve ser o passo mais vulnerável na espermatogênese e merece mais atenção. Certos agentes antifertilizantes parecem interferir na liberação do espermatozóide, outros parecem causar a liberação de formas prematuras. Qualquer um destes efeitos tem potencial para contracepção masculina (62).

3. BARREIRA TESTICULAR

As partículas maiores são geralmente excluídas dos túbulos seminíferos pela camada de células mióides peritubulares, mas partículas menores atravessam facilmente as fendas entre essas células, alcançando a base do epitélio germinativo. Elas não avançam mais devido à presença de junções de oclusão entre as células de Sertoli, que dividem o epitélio germinativo em dois compartimentos: o compartimento basal que contém espermatogônias e espermátócitos em pré-leptóteno, e o compartimento adluminal que contém os estágios mais avançados das células germinativas. Então qualquer substância que se difunde pelos espaços perivasculares do tecido intersticial tem acesso às espermatogônias em repouso no compartimento basal, entretanto as junções de oclusão constituem uma barreira que isola as células germinativas em diferenciação do compartimento extracelular (62).

As junções de oclusão são a base morfológica da barreira testicular (62).

Entre as células de Sertoli e as células germinativas há junções desmossoma-"gap". O desmossoma é um componente de adesão, que mantém a integridade do epitélio seminífero e assegura que as células de Sertoli e as células germinativas permaneçam em registro, quando as células germinativas se movem para a luz do túbulo seminífero. A junção "gap" acopla as células iônica e metabolicamente, pois permite a passagem de moléculas acima de 1,2 kDa (169).

As células de Sertoli respondem a uma variedade de agentes, sendo indicadores muito sensíveis ao dano testicular. A resposta mais comum das células de Sertoli é o desenvolvimento de vacúolos de diferentes tamanhos, que contêm água e são delimitados por membrana. Foi observada tal resposta a várias formas não relacionadas de situações experimentais, como hipoxia de alta altitude simulada, deficiência de vitamina A, indução de orquite alérgica e administração de bis-dicloroacetildiamina, um agente antifertilizante, e de 2,3,5 tris-etileno iminobenzíquinona, um agente alquilante. Não se sabe ao certo se estes vacúolos surgem da

dilatação das cisternas do retículo endoplasmático ou da endocitose de gotas de fluido. Este acúmulo de fluido deve resultar de dano ao processo de secreção ou a um mecanismo de transporte transcelular (62).

Vacúolos ocorrem principalmente nos túbulos de estágio VII e VIII, e geralmente em posição supranuclear nas células de Sertoli. Também se cogita que os vacúolos sejam resultantes da degeneração das células germinativas dentro da região basal do epitélio seminífero. Vacúolos grandes permanecem depois do desaparecimento das células germinativas em degeneração (101). Entretanto a análise ultra-estrutural (71) e a vacuolização das células de Sertoli em testículos criptorquídeos com somente células de Sertoli (15) reforça a teoria que os vacúolos estão dentro das células de Sertoli.

Dano às células de Sertoli pode resultar na liberação dos corpos residuais (excesso de citoplasma perdido pelo espermatozóide) para a luz dos túbulos seminíferos. Os corpos residuais normalmente permanecem retidos no epitélio (62).

Então o dano às células germinativas pode ser secundário à interferência com a função das células de Sertoli (62).

4. ALTERAÇÕES NA ESPERMATOGÊNESE

Na biópsia do testículo, BILLIS (21) resume as alterações na espermatogênese nos seguintes padrões histológicos:

- Aplasia germinativa: os túbulos seminíferos são revestidos apenas por células de Sertoli. Há grandes vacúolos que correspondem às áreas anteriormente preenchidas por células germinativas.
- Parada de maturação: pode ocorrer em diferentes níveis da espermatogênese, em espermátócitos primários ou secundários e em espermátides.
- Fibrose peritubular: há o espessamento fibroso da túnica própria dos túbulos seminíferos até hialinização completa dos túbulos. Neste processo, o túbulo sofre hipotrofia (redução de calibre) e as células germinativas desaparecem, restando as células de Sertoli.
- Hipospermatogênese: há uma redução no número de espermatozoides que é refletido na diminuição da espessura do epitélio germinativo e numa pobreza dos diferentes tipos celulares que o constituem. Também é denominada de maturação incompleta ou de epitélio germinativo com descamação.
- Hiperplasia das células de Leydig: este diagnóstico deve ser feito com cautela, pois as células de Leydig tendem a se aproximar toda vez que há hipotrofia dos túbulos seminíferos.

5. ULTRA-ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE

O espermatozóide pode ser dividido em duas partes: a cabeça e a cauda.

A cabeça contém o núcleo, com o material genético altamente empacotado, e o acrossoma, uma vesícula com cerca de 10 enzimas hidrolíticas, que permitem a passagem do espermatozóide pelas camadas envoltórias do óvulo.

Entre o segmento apical do acrossoma e a ponta do núcleo há o espaço subacrossômico, que, na maioria das espécies, é pequeno, mas, nos espermatozóides de ratos e camundongos, este espaço é grande e é ocupado por uma estrutura densa, resistente, chamada "perforatorium". Este é um termo inadequado, relacionado com a idéia antiga e não comprovada da função mecânica na penetração do óvulo. O "perforatorium" do rato foi isolado e é um polipeptídeo com 13 kDa (61).

A isoenzima desidrogenase láctica que é específica do espermatozóide (LDH - X) está localizada em maiores concentrações na membrana pós-acrossômica do que na superfície de espermatozóide de camundongo (61).

Imediatamente abaixo da cabeça do espermatozóide há a peça conectora. Esta estrutura complexa tem uma região articular convexa, densa, chamada "capitulum". Filamentos finos atravessam o espaço elétron-lúcido, estreito entre o "capitulum" e a placa basal. Eles parecem ser responsáveis pela ligação da cabeça à cauda (61).

A cauda pode ser dividida em três segmentos: a peça intermediária, a peça principal e a peça final. A peça intermediária é caracterizada por uma bainha de mitocôndrias orientadas circunferencialmente em torno do axonema. Na sua parte final, uma estrutura densa anelar, o "annulus", está firmemente aderida à membrana plasmática e impede o deslocamento das mitocôndrias durante os movimentos da cauda. Na peça principal, o axonema (conjunto 9+2 de microtúbulos) é fechado por uma bainha de fibras densas circunferenciais. A peça final é a porção além do final da bainha fibrosa, consistindo somente do axonema (61,69,133).

SUBSTÂNCIAS QUE AFETAM A ESPERMATOGÊNESE

1. AGENTES FARMACOLÓGICOS

1.1 - ALFA-CLORIDRINA E DERIVADOS

A alfa-cloridrina, no início das investigações, era considerada uma droga com atividade pós-testicular, pois se acreditava que sua ação era restrita ao espermatozoide no epidídimo. Outros trabalhos, porém, mostraram que tem ação sobre as células do testículo e do epidídimo, bem como das glândulas sexuais acessórias.

Esta substância torna-se presente no fluido da "rete testis" em ratos quase tão rapidamente como água tritiada, alcançando os níveis sanguíneos dentro de 40 min (175). As células próximas à membrana basal dos túbulos seminíferos (as espermatogônias) são as primeiras a serem afetadas. Posteriormente os espermatócitos, as espermatídes e os espermatozoides, nesta sequência, desaparecem do epitélio germinativo. Entretanto há repopulação dos túbulos seminíferos com a retirada da droga (53).

Esta droga atua diretamente no metabolismo das células do testículo e do epidídimo, através da redução na atividade da ATPase (182), do aumento do catabolismo de RNA e proteínas (98) e do prejuízo da glicólise (99,100). A redução na atividade da ATPase, o que sugere uma queda na síntese protéica, pode ser responsável pela inibição da espermatogênese (182). A glicólise deficiente provoca uma menor entrada de precursores, como piruvato, no ciclo de Krebs, o que diminui sua velocidade. Há ainda uma diminuição na atividade das três principais enzimas do ciclo de Krebs (isocitrato desidrogenase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase). A velocidade do ciclo de Krebs também é reduzida pela baixa disponibilidade de aminoácidos em geral, por causa da menor atividade de gama-glutamil-transpeptidase (γ -GTP). Esta enzima está associada ao transporte de aminoácidos através da membrana (99,100).

A enzima γ -GTP, por estar envolvida com o transporte de aminoácidos e com a síntese protéica, pode ter um papel na síntese de ABP (proteína que se liga ao andrógeno) e/ou do fator que inibe o FSH (inibina), também produzido pelas células de Sertoli. A sua diminuição nas células do testículo pela alfa-cloridrina pode levar a uma interferência na síntese de ABP (98). Alterações nos níveis de ABP nos testículos, no epidídimo e no soro ocasionadas pelas altas doses desta droga foram mencionadas (119).

Normalmente há uma alta atividade de γ -GTP no epidídimo, sugerindo que haja um ciclo de γ -GTP nas membranas das células epiteliais do epidídimo. A γ -GTP deve estar envolvida com a absorção de aminoácidos do fluido proveniente dos testículos. Os baixos níveis de γ -GTP, após o tratamento, indicam uma perturbação do fenômeno de absorção. Os aminoácidos não podem ser transportados na velocidade normal e consequentemente a síntese

protéica será mais lenta (40,100).

Aparentemente alfa-cloridrina entra nos espermatozóides e, por ter uma estrutura semelhante ao glicerol, compete com ele pela enzima glicerol quinase e torna-se fosforilada. O produto, alfa-cloridrina fosfato, é um inibidor de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. A taxa de glicólise do espermatozóide, o consumo de oxigênio e a concentração de ATP são reduzidas, diminuindo a motilidade, e assim a fertilização é evitada (24,94,119, 182,194).

A composição do sêmen dos animais tratados é diferente daquela dos não submetidos à droga, e isto pode ser responsável pela inibição no transporte dos espermatozóides. Alfa-cloridrina pode competir com o glicerol na síntese de fosfolipídios no epidídimo. Outra hipótese envolve o zinco. A falta de zinco nas etapas espermatogênicas e/ou a alta concentração de zinco no fluido seminal bloqueia o gasto de energia no espermatozóide necessário para a motilidade (194,195). O aumento na acidez do fluido no lúmen dos túbulos seminíferos e do epidídimo também pode ter um papel importante no efeito contraceptivo (29).

Alguns autores propõem que o efeito desta droga não seja devido a uma interferência na secreção de proteínas específicas por parte do epidídimo, mas sim na aquisição destas proteínas pelos espermatozóides nesse órgão, já que foram encontradas proteínas diferentes na superfície do espermatozóide (192).

As mudanças produzidas na atividade enzimática dos testículos e nas secreções dos órgãos sexuais acessórios podem ser devidas à natureza antiandrogênica da alfa-cloridrina (86).

Esta droga exerce seus efeitos nas estruturas dependentes de andrógeno como vesícula seminal, próstata ventral, epidídimo e complexo "perineal" (incluindo os músculos "levator ani", pênis e bulbo do pênis). Estes efeitos são reversíveis (53,54).

Em doses mais elevadas, alfa-cloridrina afeta os ductos eferentes e a cauda do epidídimo por um mecanismo não conhecido que leva à oclusão destas estruturas, evitando a passagem do espermatozóide do testículo ao epidídimo. Esta ação resulta na infertilidade prolongada ou até mesmo permanente (94).

Estudos da OMS, em primatas, revelaram que alfa-cloridrina é tóxica, pois provoca dano à hematopoiese e outros efeitos, não permitindo seu uso em homens (98,99).

1.2 - ACETATO DE CIPROTERONA E COMPOSTOS DERIVADOS

Acetato de ciproterona é uma progestina. As progestinas podem inibir ou potencializar a ação do androgênio. Tanto a atividade antiandrogênica como a sinandrogênica das progestinas podem ser explicadas pela sua interação com o receptor para androgênio. Foi sugerido que o receptor para androgênio seja uma proteína alostérica com múltiplos sítios de ligação, podendo aceitar tanto androgênio como progestina (137).

O acetato de ciproterona compete com a testosterona pelos seus sítios receptores nos órgãos alvo, tendo uma ação antiandrogênica. Provoca a involução e atrofia destes órgãos, a redução do retículo endoplasmático rugoso, dos ribossomos livres e do Golgi nas células destes e a diminuição da secreção (46,110,132,167,188). Em homens tratados com acetato de ciproterona, o volume do ejaculado diminuiu bastante (136).

Além de afetar as vesículas seminais e o epidídimo, afeta os testículos. Diminui a atividade enzimática e parâmetros bioquímicos essenciais para a espermatogênese, levando a mudanças nas células germinativas, de Sertoli e de Leydig (19). Células germinativas se desenvolvem até espermatídes na fase de capuz e então degeneram. As células de Sertoli contêm grandes gotas lipídicas e estruturas como lisossomos com fragmentos celulares, que são possivelmente partes de espermatídes. A diminuição na quantidade de ABP também reflete o dano das células de Sertoli. A redução dos níveis de testosterona plasmático e testicular, por sua vez, demonstra que a secreção das células de Leydig é afetada, o que também é constatado pelo menor tamanho dos seus núcleos (65,79,163).

O acetato de ciproterona tem sido excluído dos possíveis contraceptivos masculinos, porque são necessárias, no mínimo, dez doses, mesmo elevadas, para inibir a espermatogênese, o que provocaria atrofia das glândulas sexuais acessórias (188).

1.3 - BIS-DICLORO-ACETIL DIAMINAS

Estes compostos foram originalmente usados para tratamento de infecções intestinais causadas pela ameba (170). Durante os estudos sobre toxicidade crônica, verificou-se que alguns destes compostos inibiam a espermatogênese no rato, cão e macaco (43). Foram então testados em prisioneiros voluntários. Suprimiram completamente a produção de espermatozoides, que retornava ao normal, quando a droga era suspensa. A investigação foi interrompida por estar associada a um aumento na frequência de hepatite entre os prisioneiros e, quando testada em outros grupos voluntários, potencializar os efeitos vasculares do álcool. Ficaram dúvidas se a hepatotoxicidade era realmente devida à droga e uma nova avaliação destes compostos faz-se necessária (17).

O análogo mais estudado e mais potente é o N-N1- bis(dicloroacetil)-1,8 octanediamina (WIN 18,446). Em doses de 125 mg, duas vezes ao dia, produziu severa oligospermia no homem (154). Ele tem um efeito destrutivo sobre os espermátócitos (73).

Além dos espermátócitos, as bis-dicloro-acetil diaminas afetam as espermatídes alongadas, onde uma grande distorção do acrossoma é observada (66). A atividade antiespermatogênica é reversível (119). Há ainda o surgimento de vacúolos nas células de Sertoli (119) e hiperplasia nas células de Leydig (14). Foram observadas uma elevação do FSH e do LH e uma diminuição dos níveis de testosterona (73,119).

1.4 - 5-TIO-D-GLICOSE

Tioglicose é um análogo da glicose, sendo que difere desta pela presença de um átomo de enxofre, ao invés do oxigênio, na ligação entre o C1 e o C5 do seu anel estrutural. O composto foi mencionado pela primeira vez em 1962 (10).

Esta substância afeta o transporte celular da D-glicose. Seu principal efeito é interferir no metabolismo da hexose no testículo e na produção de energia (119).

As espermátides são as células testiculares mais vulneráveis aos efeitos da tioglicose, porque são altamente dependentes da glicose como fonte de energia para a síntese protéica. Assim há uma inibição significativa da síntese protéica nestas células (138).

Inibição da síntese protéica nos espermatócitos também é mencionada (119). As células de Sertoli ou de Leydig, por sua vez, não são afetadas (84,138). A resistência das células de Leydig pode ser importante para explicar por que a droga não é descrita como afetando a libido (138).

Foi observada, além da degeneração das células germinativas, a produção de células gigantes multinucleadas nos túbulos seminíferos (84,124,125). Irregularidades na citocinese e cariocinese podem ser responsáveis por estas células multinucleadas (119). Efeito inibitório na divisão celular já havia sido observado (124).

Seu efeito é reversível (84,124,125).

1.5 - PIPECOLINOMETIL 1,5 - HIDROXIINDANO

DL - 6 (N - pipecolinometil 1,5 - hidroxindano malato) (PMHI) interferiu na fertilidade de ratos machos (22,23).

PMHI atua primariamente nas células de Sertoli, onde foram observados vacúolos e, em consequência, pode afetar as células germinativas das primeiras fases da espermatogênese (60,119). Este composto provoca ainda bloqueio da espermiogênese, que inclui condensação acrossômica anormal das espermátides e presença de espermátides multinucleadas (60).

As células de Leydig permanecem intactas com o tratamento (60). Não foram notadas mudanças nos níveis de FSH, LH ou testosterona (23,119).

Esta droga se acumula nos testículos ou nas vesículas seminais. Ela é parcialmente liberada na urina (119).

2. HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Nos anos 40, vários pesquisadores mencionaram que propionato de testosterona podia suprimir as contagens de espermatozóides a zero. Este efeito era considerado colateral, e nenhum dos pesquisadores sugeriu a sua adaptação para o desenvolvimento de um método contraceptivo masculino (181).

Dez anos mais tarde foi proposto o uso da supressão pela testosterona e do "rebound" (rebote) como uma medida terapêutica para a oligospermia. Os homens oligospermicos eram tratados com propionato de testosterona, resultando na supressão da produção de espermatozóides. A terapia de testosterona era suspensa e alguns pacientes tinham um "rebote", ou seja, um aumento na contagem de espermatozóides acima dos níveis do pré-tratamento. Este continua a ser um dos métodos para tratamento da oligospermia mais usado (181).

Mesmo nesta época, não foi sugerido que esse método fosse adaptado para a contracepção (181). Nos anos 70, iniciaram-se as investigações com este objetivo.

Todos os esteróides gonadais: estrógenos, progestinas e andrógenos, são capazes de suprimir a espermatogênese, mas as doses necessárias e os efeitos colaterais limitam seu uso. Isto é particularmente verdadeiro para estrógenos, que suprimem as gonadotrofinas e induzem azoospermia, mas resultam em feminilização (181). Progestinas e androgênios oferecem melhores perspectivas para a confecção de contraceptivos masculinos (160,181).

O uso de progestinas e androgênios tem sofrido considerável investigação durante os últimos quinze a vinte anos com um grau mínimo de sucesso. Várias progestinas foram empregadas sozinhas ou em combinação com testosterona através de implantes ou injeções com ésteres de prolongada ação, tais como enantato de testosterona. Em nenhum caso houve indução de azoospermia ou oligospermia (1 a 10 milhões/ml) em todos os pacientes. Além disso, houve diminuição da libido em 25% (11 - 100%) e ginecomastia ou dor no mamilo em 4% (0 - 11%) (181).

Os androgênios estudados até agora incluem a testosterona, o cipionato de testosterona e o enantato de testosterona. Os progestogênios incluem o acetato de medroxiprogesterona (DMPA), o levonorgestrel, a norgestrienona, o Danazol, o R2323, o acetato de megestrol, o acetato de ciproterona e a noretandrolona (159).

A combinação mais promissora foi a de DMPA com um androgênio (155). Estudos com DMPA combinado com ésteres de testosterona revelaram que, em mais de 75% dos homens, as concentrações de espermatozóides foram reduzidas a menos de um milhão por ml. Em alguns, a produção de espermatozóides foi interrompida completamente (160).

A manutenção da azoospermia foi associada à permanência do LH a níveis indetectáveis. A ausência de espermatozóides depende da presença de "feedback" negativo de testosterona sobre o LH, resultando na supressão da produção de andrógenos no testículo. Ainda não é

possível concluir se a síntese e/ou a liberação de LH seja regulada pelos níveis absolutos de testosterona circulante, ou se esta regulação se deve a outros fatores como, por exemplo, o caráter oscilatório da secreção de testosterona. É possível que o LH tenha sua secreção regulada pelas oscilações de testosterona, quer pela amplitude, quer pela frequência dessas oscilações ou ainda por ambos (183).

A testosterona exógena induz atrofia germinativa pela supressão da concentração do LH no soro e subsequente redução na produção de testosterona testicular, cujo nível normalmente é alto para manter o epitélio germinativo (181,197). Os túbulos seminíferos são normalmente envolvidos por linfa, contendo acima de dez vezes mais testosterona por unidade de volume do que o sangue arterial que entra nos testículos (142).

Em doses apropriadas e a intervalos de tempo adequados, a administração de testosterona produz azoospermia, que pode ser mantida por períodos prolongados, que, provavelmente, não resultam em aumento dos valores plasmáticos desse hormônio a ponto de significar algum risco (183).

A dinâmica do "feedback" negativo é de tal ordem que a manutenção dos níveis plasmáticos de testosterona em valores próximos do normal é suficiente para manter a supressão do LH e da espermatogênese (183).

O esquema terapêutico mais adequado de testosterona, mais precisamente de enantato de testosterona, que é um éster de prolongada ação, consiste em uma fase de indução, onde altas doses são aplicadas num período curto, com o objetivo de iniciar a supressão da função testicular, e em uma fase de manutenção com injeções a intervalos não superiores a dez dias. Assim, pode-se conseguir uma supressão uniforme e a manutenção das contagens de espermatozoides abaixo de 0,3 milhões/ml, sem elevar os níveis de testosterona circulantes acima dos valores normais, exceto durante as primeiras duas semanas de tratamento (181).

Intervalos maiores do que dez dias parecem resultar em um aumento nos níveis de LH do soro, seguido pelo surgimento de espermatozoides no ejaculado, provavelmente precedido por uma elevação nos níveis de testosterona intratesticular (181).

As progestinas, em doses moderadas, atuam como antigonadotrofinas, restringindo a produção de FSH e LH de maneira a inibir, tanto a espermatogênese, como a esteroidogênese. A progestina leva à atrofia das glândulas sexuais acessórias e à perda da libido, sendo necessária a administração de testosterona simultânea para evitar estes efeitos (188).

Um problema deste método é que a testosterona e seus ésteres, por não serem efetivos por via oral, têm que ser administrados por via parenteral. A procura de ésteres de testosterona efetivos por via oral levou à síntese do undecanoato de testosterona. Este, porém, teve uma baixa eficácia, o que foi explicado por sua meia-vida curta. Então, para se ter a supressão da espermatogênese com este éster seria necessário usar altas doses ou induzir a supressão inicial de LH, a produção de testosterona intratesticular e a espermatogênese com enantato de testosterona (via parenteral) e então substituir pelo undecanoato de testosterona para manter a supressão (153).

Um composto bastante estudado foi o Danazol (17 alfa-preg-4-en-20-ino-(2,3-d)isoxanol-17-ol), um proandrogênio ativo oralmente (153). Sua administração concomitante com enantato de testosterona produziu oligospermia severa e azoospermia, mas não diminuiu a libido e a potência (181). Em doses adequadas, Danazol e undecanoato de testosterona suprimem a espermatogênese, retardam a maturação dos espermatozóides e reduzem a viabilidade e a motilidade dos espermatozóides no epidídimo, através da diminuição dos níveis de testosterona nos testículos e da alteração do conteúdo de fosfolipídios e de proteínas no epidídimo (122). Foi demonstrado também que Danazol suprime o crescimento dos órgãos dependentes de androgênio (52).

3. ANÁLOGOS DE LHRH

A caracterização da sequência de aminoácidos do LHRH, em 1971, por SCHALLY & GUILLEMIN, permitiu a síntese de análogos desta substância (68).

Os análogos podem ser agonistas, isto é, atuam de maneira semelhante ao LHRH, ou antagonistas, pois bloqueiam o efeito do LHRH (13). A maioria dos estudos feitos no homem envolveram agonistas que causam, depois de um breve aumento inicial dos níveis de FSH e LH, um decréscimo de até 40 ou 50% nesses níveis. Nenhum dos compostos, entretanto, interrompeu completamente a produção de espermatozóides, e com a redução dos níveis de testosterona, há casos de impotência. Todos os efeitos são reversíveis (118).

Os análogos de LHRH provocam mudanças degenerativas nas células germinativas e nas células de Sertoli, inibindo a proliferação das espermatogônias e dos espermátócitos primários (193).

4. PLANTAS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PLANTAS

4.1 - GOSSIPOL

As pesquisas sobre o gossipol, como anticoncepcional, foram iniciadas na China em 1971, depois da descoberta de que a baixa fertilidade apresentada pelos lavradores das plantações de algodão era devida ao fato de que eles cozinhavam com óleo de algodão não refinado (140). Gossipol é um pigmento fenólico amarelo encontrado na semente, no caule e nas raízes do algodoeiro (148).

Gossypium barbadense já era usada pelos mexicanos (39) e indianos (34) como emenagoga e abortiva. Testes farmacológicos com suas raízes comprovaram isto por ser estimulante das contrações uterinas (198).

Os testes clínicos visando utilizar o gossipol como contraceptivo masculino iniciaram em 1972, na China (139). Gossipol foi administrado a mais de 4000 homens durante seis meses. A eficácia foi de 99,89% (141).

Há dois mecanismos de ação do gossipol sobre a espermatogênese:

1) Um, envolve a desorganização da bainha mitocondrial na peça intermediária da espermátide. A degeneração das mitocôndrias inicia no estágio 17 da espermiogênese, aumenta e resulta, no estágio 19, em uma fenda distinta na bainha mitocondrial (83,96,149). Tal processo é denominado aplasia de um segmento da bainha mitocondrial. Esta alteração favorece o surgimento de outras lesões quando o espermatozóide alcança o segmento distal do epidídimo. Entre essas lesões há o deslocamento das fibras densas ao nível da lacuna, a quebra do flagelo e a decapitação do espermatozóide. O segmento ausente da bainha mitocondrial provavelmente representa um ponto de enfraquecimento no anel estrutural que suporta o feixe de fibras densas durante a onda de contração (148). Além da desorganização do aparelho motor, há prejuízo do sistema energético: redução na utilização de glicose e na degradação da frutose a gás carbônico e desacoplamento da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa (96). "In vitro", foi demonstrada a inibição da cadeia respiratória (107).

2) O segundo mecanismo envolve a degeneração das células germinativas nos estágios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero, uma retenção das espermátides no estágio 19 e uma esfoliação irregular das espermátides e espermátócitos. Aparentemente o dano à diferenciação da célula germinativa é mediado por um mau funcionamento das células de Sertoli, devido à ausência da estimulação por andrógeno (149,200). Vacúolos nas células de Sertoli foram observados (83).

Assincronia no desenvolvimento das células germinativas, redução das camadas celulares do epitélio seminífero e esfoliação de células germinativas foram observadas nos testículos de animais tratados com gossipol. A formação de um aglomerado de células

germinativas, incluindo espermatogônias, e de células de Sertoli, que foram deslocadas para a luz do túbulo seminífero, sugerem que as pontes intercelulares nas células germinativas se desintegram e que as junções do tipo "tight" entre as células de Sertoli, importantes para manter a barreira testicular, estejam danificadas (78).

O primeiro tipo celular afetado pelo gossipol é a espermátide. Com mais tempo de tratamento os espermatócitos são afetados e depois as espermatogônias (87,139,161,201). A fase acrossomal (estágios XII-XIV) e a de maturação (I-VII) são as fases da espermiogênese mais prejudicadas pelo gossipol (78).

Foi observada a inativação da lactato desidrogenase-X que é específica do espermatozóide (72,108,114,134,184), mas aparentemente isto não é a causa primária da imotilidade do espermatozóide (184). As enzimas que metabolizam os nucleotídeos nos espermatozóides também são afetadas pelo gossipol, o que pode representar um mecanismo possível para a inibição da função normal do espermatozóide (151). A adenilato ciclase é inibida devido à interação direta do gossipol com a região da subunidade catalítica da enzima, onde se ligaria o nucleotídeo AMP (150). A ribonucleotídeo redutase, enzima importante para a síntese de DNA, também é inibida (128).

Alguns autores não encontraram interferência na biossíntese de andrógenos nos testículos por parte do gossipol (97), entretanto outros (55,156,157,185) verificaram que o mesmo inibe a esteroidogênese nas células de Leydig, chegando a concluir que a oligospermia e a azoospermia podem ser secundárias à diminuição da síntese de testosterona (117,157). A deficiência de andrógeno também é constatada pela atrofia dos órgãos sexuais secundários (78,87).

O metabolismo de proteínas e ácidos nucléicos nos órgãos sexuais secundários é também inibido pelo gossipol (42).

Os efeitos colaterais registrados foram: fadiga (12%), problemas gastrointestinais (7%), diminuição da libido (5%), hipocalcemia, isto é, deficiência de potássio (1%) e esterilidade irreversível (9,92%) (44).

4.2 - TRYPTERYGIUM WILFORDII HOOK

Esta planta tem dois a três metros de altura. O extrato do xilema da raiz é usado sob a forma de tabletes para tratamento de artrite reumatóide e várias desordens da pele. A dose efetiva para inibir a fertilidade é de um terço da dose recomendada para estas outras finalidades (164).

Diminui a viabilidade, a motilidade e a densidade dos espermatozóides e aumenta a porcentagem de espermatozóides deformados. O prejuízo aos túbulos seminíferos é mínimo. Nenhuma mudança nas células de Leydig foi observada, bem como alterações no nível de testosterona e de LH do soro. A libido e a potência também continuaram normais. A

infertilidade é reversível (164,165).

Os tipos de células germinativas mais sensíveis são as espermatídes e os espermatócitos em paquíteno. Espermatídes deformadas e fagocitadas pelas células de Sertoli foram observadas (164).

Glicosídeos de *T.willfordii* administrados oralmente em ratos, numa dose de 30 mg/kg, por 80 dias, provocaram mudanças degenerativas nos túbulos seminíferos e nos espermatozóides e diminuíram os níveis de testosterona plasmática (203).

4.3 - EMBELIN

Embelin é o princípio ativo das sementes de *Embellia ribes* Burm. Seu nome químico é 2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona. É isolado das sementes secas com benzeno quente (75).

Diminuiu os parâmetros de fertilidade, baseados em número de prenhez e tamanho das crias (75). A administração de embelin nas doses de 100 mg/kg/dia por 3 meses em macacos e 80 mg/kg oralmente por 100 dias em cães provocou redução na quantidade e na qualidade do sêmen, inibição da espermatogênese no estágio de espermatócito e redução na testosterona. Depois de 250 dias a espermatogênese foi recuperada (50,162).

Esta substância provoca mudanças morfológicas nos espermatozóides, como: decapitação, descontinuidade das membranas externas na peça intermediária e na cauda e alteração na forma da gota citoplasmática. Há uma diminuição na motilidade dos espermatozóides (75).

A administração de embelin interfere com o metabolismo de carboidratos dos tecidos reprodutores primários e secundários, levando a danos da glicólise, ciclo de Krebs e outros sistemas dependentes de NAD e NADP (77). Há redução na atividade das enzimas da glicólise e do metabolismo energético na peça intermediária. A limitação da utilização de hexose através da glicólise pode ser responsável pelo efeito espermatoestático (75). Há prejuízo também no metabolismo de lipídios (76).

Por causa de sua contracepção reversível e não tóxica, foi dito que o embelin poderia ser usado por homens sem risco (18).

4.4 - HIBISCUS ROSA SINENSIS Burm.

É uma planta ornamental muito cultivada na Índia e em Burma. As flores são mencionadas como contraceptivas na literatura antiga "Ayurvedic", no folclore e na "Materia Medica" (102).

Extratos de flores de *H.rosa sinensis*, administrados oralmente, apresentaram atividade contraceptiva pós-coito significativa, sendo que o extrato alcoólico alcançou 50% de eficácia e o extrato em benzeno, 83,7% (106). Quercetina e cianidina, extraídas de flores de *H.rosa sinensis*, administradas a ratas, numa dose de 250 mg/kg, não demonstraram atividade pós-coito (104), mas 250 mg/kg de "hentricontane" demonstrou atividade antiimplantação (62%) (105). As flores possuem atividade antiestrogênica (103).

A administração oral de 250 mg/kg do extrato benzênico de flores de *H.rosa sinensis*, por 30, 45 e 60 dias, a ratos provocou inibição da espermatogênese (ela foi interrompida no estágio de espermatíde, pois houve descamação de espermatócitos), perda da função endócrina dos testículos (as células de Leydig eram esparsas e atrofiadas) e da atividade secretora das glândulas sexuais acessórias. O mecanismo de ação da droga é através do eixo pituitária-testículo (102). A espermatogênese é recuperada após a suspensão do tratamento (60 dias). O extrato aquoso ou alcoólico na mesma dose, por 30 dias, não mostrou efeito (187).

4.5 - MALVAVISCUS CONZATII Greenm

É uma planta ornamental cultivada, cujas flores lembram as da *H. rosa sinensis*. Pertence à família Malvaceae. Esta e outras plantas desta família mostraram ação contraceptiva em roedores (95).

A administração oral de 30 e 50 doses (50 mg/dia/camundongo) do extrato alcoólico de flores de *M.conzatii* provocou mudanças degenerativas nos túbulos seminíferos, que ficaram reduzidos a uma ou duas camadas de células germinativas, e deficiência na produção de andrógeno, refletida pela atrofia das glândulas sexuais acessórias (95).

4.6 - DIEFFENBACHIA SEGUINE (Jacq.) Schott

É uma folhagem ornamental, pertencente à família Araceae e é nativa das Américas. É semelhante a "comigo ninguém pode", cujo nome científico é *D.maculata* (Lodd.) G.Don ou *D.picta* Schott. Ambas são usadas praticamente sem distinção (27).

Várias partes dessas plantas possuem um suco cáustico que, ao contato, causa queimaduras da pele e das mucosas. A toxicidade desta planta deve resultar de fatores mecânicos e químicos. Milhões de ráfides, cristais de oxalato de cálcio em forma de agulha, são liberadas de dentro da célula, quando a planta é mastigada, e uma fração protéica venenosa penetra as lesões feitas pelos cristais. Os efeitos são: irritação cáustica das membranas, salivação intensa e edema, que podem interferir na deglutição e na respiração por vários dias a uma semana (135). As ráfides podem ser destruídas pela secagem ou aquecimento (67).

Uma tintura do suco das raízes é empregada para curar prurido dos genitais (41). Algumas

mulheres usam a infusão para dismenorréia (158). Em Cuba, ela é empregada como um afrodisíaco pelas mulheres que colocam o seu suco nos genitais, mas aparentemente não tem nenhuma ação sobre o homem (171).

Esta planta tem sido usada como contraceptivo pelos nativos de Guadalupe, Porto Rico, Santa Lúcia e Cuba. Os habitantes das Antilhas dizem que o efeito esterilizante, no homem, dura um ou dois dias após ela ser mastigada (57).

A propriedade esterilizante desta planta atraiu a atenção dos nazistas. Em 1940, médicos alemães publicaram um trabalho onde demonstraram que o extrato de *D.seguine*, administrado oralmente ou injetado em animais, causou mudanças orgânicas que lembravam castração (123). Em outubro de 1941, Adolph Pokorny, um dermatologista na Czechoslovakia, sugeriu a Himmler que esta planta fosse usada para esterilizar os prisioneiros soviéticos. Himmler, por sua vez, instruiu Pohl, que era responsável pelos campos de concentração, que classificasse todas as informações sobre a planta e que começasse a cultivá-la. O plano falhou, quando o Brasil declarou guerra à Alemanha e cortou o suprimento da planta. Mas experimentos com prisioneiros chegaram a ser realizados (190).

4.7 - POLYGONUM HYDROPIPER L.

P.hydripiper pertence à família Polygonaceae. Seu nome vulgar é erva-de-bicho e é usada popularmente para hemorróidas, úlceras e erisipela.

O pó obtido da secagem do extrato da planta era usado na Europa Central como contraceptivo e emenagogo (48). Na zona rural do Paraguai, as mulheres utilizam folhas e talos de *P.puctatum* Elliot para regular a fertilidade. Tomam o decocto ou o macerado frio antes ou depois da data da menstruação, uma ou duas vezes por dia (6,82).

As fêmeas de camundongos que receberam uma dieta contendo 25% e 50% do pó obtido da secagem da planta apresentaram uma ausência temporária do estro (202). Contudo alguns autores sugerem que este resultado seja devido a uma deficiência nutricional (9). Uma dieta contendo 1g da planta, por 77 dias, no entanto, também provocou a inibição do ciclo estral e impediu a ovulação. Os machos que receberam essa dieta tornaram-se inférteis. Como o ciclo estral retorna ao normal com a retirada da droga e as fêmeas ficam prenhes, a função gonadotrófica da pituitária deve ser modificada pelo tratamento. *P.hydripiper*, entretanto, não mostrou atividade estrogênica ou androgênica, quando testada em camundongas ovariectomizadas e ratos castrados (58). O extrato de *P.multiflorum* Thunb. mostrou efeitos antiprogestacionais (56).

Algumas substâncias isoladas desta planta, como o poligodol, a rutina e a quercetina, não afetaram a fertilidade. Então estas não devem ser o princípio ativo responsável pelos efeitos sobre a reprodução (9,58).

CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PLANTAS UTILIZADAS

1. *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L.

A.millefolium pertence à família Asteraceae e é conhecida vulgarmente como "milfolhas". É encontrada na Europa e foi introduzida na América do Norte (35).

Foi usada por Achilles, herói grego, em 1200 a.C., para tratar as feridas de seus soldados. É utilizada na medicina popular para tratamento de hemorragia, úlcera, diarreia, câncer, tumor, condiloma, verruga, leucorréia, gripe, pneumonia, etc. É considerada abortiva, contraceptiva, emenagoga, cicatrizante, analgésica, antiinflamatória, febrífuga, anti-helmíntica... (35,56).

No norte da Europa e em tribos indígenas norte-americanas, era usada como contraceptiva, abortiva e emenagoga na forma de infusão quente (35,48).

Sua composição química foi determinada (59,89,90,91,92,189). Nas flores, foram identificados lipídios, resinas e tanino (189).

Muitos dos seus efeitos foram explicados após o conhecimento de sua composição química. Por exemplo, aquileína, um alcalóide, é um agente hemostático ativo. Tujona, também encontrada em outras plantas, é um abortivo e, possivelmente, responsável pelo uso desta planta no tratamento de problemas relacionados com o aparelho reprodutor feminino. A analgesia resulta de derivados do ácido salicílico, eugenol, mentol e outros componentes presentes no óleo volátil. Tanino, esteróis, triterpenos e substâncias do óleo volátil, como cânfora, azuleno, sesquiterpenos e mentol, possuem atividade antiinflamatória. Flavonóides têm atividade espasmódica (35).

Saponinas também estão presentes (189). Estas substâncias têm atividade espermicida, associada ao ácido beta-amirin C-28 carboxílico, tipo de sapogenina ligada a uma sequência particular de moléculas de açúcar (177). Alfa-amirin é o principal triterpeno de *A.millefolium*, mas beta-amirin também foi encontrado (36).

O extrato de flores de "milfolhas" inibiu o crescimento de estreptococcus beta-hemolíticos, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (49).

A planta misturada na dieta normal, numa concentração de 25 a 50%, suprimiu o estro (30), no entanto, em outro experimento (9), o extrato de folhas não alterou o tempo do primeiro acasalamento, a fertilidade deste e o tamanho das crias.

2. MAYTENUS ILICIFOLIA Mart. ex. Reiss

M. ilicifolia pertence à família Celastraceae e é denominada popularmente como "espinheira-santa". É encontrada no sul do Brasil, no Paraguai, no Uruguai e na Argentina (5).

Seu uso para tratamento de males gástricos é bastante difundido no sul do país. No Rio Grande do Sul, era comum adicionar 10-15% desta erva ao chimarrão para combater a azia e as gastralgias (16). Foi verificado que existe realmente uma ação preventiva e curativa para úlceras, além de combater a hiperacidez. Acredita-se que sua ação seja através do aumento do pH e do volume do suco gástrico (31).

As mulheres da população rural e indígena do Paraguai fazem uso do chá ou decocto, produzidos a partir de folhas, galhos e raízes, para regular a fertilidade (6,7,82). Algumas populações tomam o chá duas ou três vezes ao dia antes e depois da menstruação (82). Já as índias Chirita (tupi-guarani) começam a tomar o decocto após o parto e não concebem até a criança ter a idade de caminhar (7).

A decocção ou infusão da planta também é usada pelas índias paraguaias como um indutor da menstruação. São utilizadas 9g da planta por dia até a menstruação vir (5). No nordeste da Argentina, a casca e as folhas também são usadas como emenagogas e ainda como um abortivo (45). Entretanto *M. ilicifolia* (folhas e caules) e *M. boaria* (raízes), uma planta do Chile, não reduziram a frequência de implantações em hamster (126).

Estudos fitoquímicos de *M. ilicifolia* demonstraram a presença de aminoácidos, taninos ftoesteróides insolúveis em água, leucoantocianidinas, compostos fenólicos, flavonóides, glicosídeos flavonóides e saponinas (82,126). Na *M. sengalensis*, foram revelados taninos, terpenóides, flavonóides, alcalóides, esteróis e ácidos fenólicos, entre outros compostos (74).

O gênero *Maytenus* é conhecido como uma fonte de maitansinóides, triterpenos que são citotóxicos e que têm atividade antitumoral (na medicina popular, essas plantas são usadas para neoplasias) (88,178). Um exemplo de maitansinóide é a maitansina. Ela afeta a síntese de DNA (168,178) e o fuso mitótico (85,116). Interrompe a divisão celular das células de leucemia murina L1210 na metáfase (93,178,199). Maitansina é relativamente neurotóxica e, em altas doses, embriotóxica e teratogênica (178). A dose teratogênica de maitansina é aproximadamente dez vezes maior do que sua dose antitumoral (179).

A baixa concentração de maitansinóides na dose diária bebida pelas paraguaias (em 9g de folhas e galhos, há cerca de 5,331 µg de maitansinóides e, em 9g de raízes e caule, há 6,981 µg) provavelmente não causa efeitos adversos nas mulheres que tomam essa planta para regular a fertilidade (5).

Maintenina, maitansinóide isolado das raízes de *M. ilicifolia*, teve um efeito bacteriostático (115).

Foram realizadas avaliações toxicológicas pré-clínicas e clínicas com *M. ilicifolia*. A análise toxicológica pré-clínica foi realizada com camundongos e ratos, que receberam, respectivamente, doses até 100 e 360 vezes maiores àquelas tomadas pelo homem. A administração foi por via oral, diariamente, por dois a três meses. A posologia popular é em torno de uma xícara (140-150ml) de chá ou abafado (água é jogada sobre as folhas, e o recipiente é tampado), preparado com cerca de 3g de pó das folhas. Ratos que receberam uma dose 40 vezes maior do que aquela geralmente usada pelo homem não apresentaram alterações na espermatogênese ou nas glândulas sexuais acessórias, as fêmeas não sofreram mudanças no seu ciclo estral, e os filhotes gerados desenvolveram-se normalmente. Doses até 360 vezes maiores não produziram alterações no peso, no comprimento, na temperatura e nos parâmetros bioquímicos séricos e hematológicos de ratos. Camundongos que ingeriram doses até 100 vezes superiores à posologia humana também não apresentaram nenhum efeito deletério (33).

A notável ausência de toxicidade da "espinheira-santa" não permitiu ainda a determinação da DL50. Camundongos sobreviveram inclusive a doses 1600 vezes maiores do que a tomada pelo homem, o que corresponde a 10,88 g/kg do animal (131).

A primeira fase da análise toxicológica em voluntários mostrou que espinheira-santa não é tóxica para o ser humano. No experimento, o abafado era de 6g de folhas moídas com 150ml de água fervente (as pessoas geralmente usam 3g/150ml) (32).

OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito de extratos de *Millicifolia* ("espinheira-santa") e *A.millefolium* ("milfolhas") sobre a espermatogênese. Estas espécies são plantas medicinais, com amplo uso popular e são inclusive utilizadas como reguladoras da fertilidade feminina. O camundongo foi utilizado como modelo experimental, e os testículos foram analisados morfológicamente, em microscopia de luz e eletrônica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos Swiss, machos, adultos, de dois a seis meses de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, Campinas, e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, onde estavam sujeitos a uma variação de temperatura de 25 a 28°C. Os animais receberam ração Nuvilab Cr 1 (Nuvital) e água "ad libitum".

2. MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO

Amostras secas de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss e flores de *Achillea millefolium* L. foram fornecidas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, em Paulínia, onde são cultivadas. Uma segunda amostra de *A. millefolium* foi obtida da Albano Ferreira Martins Ltda, comércio de plantas medicinais, de São Paulo, SP.

A primeira extração de *M. ilicifolia* foi realizada com 40g de folhas moídas e 1,5 l de álcool 99,56% (comercial). As folhas foram colocadas em frasco âmbar de boca larga, com 500 ml de álcool. Agitou-se em intervalos frequentes, durante 24h. O extrato foi filtrado e mais 500 ml de álcool foi adicionado ao frasco com o material vegetal. Repetiu-se a operação, ou seja, o extrato foi filtrado e mais 500 ml de álcool foi colocado no frasco, que foi agitado. Após 24h, todo o conteúdo do frasco foi filtrado. O obtido foi evaporado em Rotavapor "El Buchi", a 40°C, resultando 6,67g de material seco. Um rendimento de 16,7% a partir do peso inicial.

A segunda extração de *M. ilicifolia* foi realizada com 100g de folhas moídas (a quantidade ideal) e com álcool 96%. O extrato foi concentrado. Uma alíquota de 0,2ml do extrato foi colocada em três béqueres. Os béqueres foram pesados antes e depois de o extrato ser colocado. Eles foram então colocados na estufa a 60°C por 1h e novamente pesados após retomar a temperatura ambiente. Assim verificou-se o peso seco: 0,079g (média) para 0,2ml (ou 0,395g para 1ml). Como foi obtido 45 ml do extrato, têm-se então 17,78g. O rendimento foi de 17,78%. O extrato foi evaporado até a secura em Rotavapor "El Buchi", a 40°C.

O primeiro extrato de *A. millefolium* foi realizado com 47g das flores moídas e álcool 99,56% (comercial). O extrato foi concentrado, obtendo-se 4,23g de um material consistente, possivelmente devido à presença de óleos fixos. O rendimento foi de 9%.

A segunda extração de *A. millefolium* foi realizada com 96,843g de flores moídas e com álcool 80% (1900ml + 270ml + 250ml em três dias, totalizando 2,42 l de álcool 80%). Foi obtido 14,3g de material seco, resultando num rendimento de 14,77%.

3. PROCEDIMENTO

Inicialmente foi realizado um estudo-piloto para identificação do material anátomo-histológico e para padronização da técnica histológica.

Experimento 1:

Foi administrado a cinco camundongos 200 mg/kg/dia do primeiro extrato alcoólico das folhas de *Millicifolia*, via intraperitoneal, durante 20 dias. O extrato seco (40mg) foi emulsionado com quatro gotas (cerca de 0,2ml) de Cremophor (Sigma) e diluído em salina 0,15M (2ml). Aos cinco animais do grupo controle foi administrado somente o veículo (Cremophor e salina).

Os animais foram mortos após 24h da última dose, por deslocamento cervical. Eles foram pesados antes e logo após serem mortos. Foram dissecados e os órgãos do aparelho reprodutor, bem como o fígado e o rim, retirados. Os órgãos do aparelho reprodutor foram pesados e fixados para estudo da morfologia.

Os testículos foram fixados em líquido de Bouin e o epidídimo, em formol neutro tamponado, ambos por 24h. O material fixado em formol neutro tamponado foi colocado em água corrente por 12h antes de ser submerso em álcool 70%. O material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Foram realizados cortes com 5µm de espessura dos testículos e cortes com 7µm dos epidídimos. As lâminas histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H/E).

Para avaliar a toxicidade da droga, a nível morfológico, pedaços do fígado e do rim foram fixados em formol neutro tamponado, desidratados, incluídos em parafina, seccionados (7µm) e corados com H/E.

Experimento 2:

Foi administrado a nove camundongos 200 mg/kg/dia do extrato alcoólico das flores de *A.millefolium*, via intraperitoneal, durante 20 dias. O extrato foi emulsionado com Tween 20 (Sigma) (198) e diluído em salina 0,15M. Sete camundongos foram usados como controles.

Foram seguidos os demais passos descritos no primeiro experimento. Entretanto os testículos e epidídimos de alguns animais foram fixados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5%) em tampão cacodilato 0,1M por 24h.

Porções dos testículos de alguns animais foram destinadas à microscopia eletrônica. O material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 1h e corado com acetato de uranila 2% por 2h. Foram obtidos cortes semifinos que foram corados com azul de toluidina 1% numa

solução de carbonato de sódio 0,5%, e cortes ultra-finos, que foram corados com citrato de chumbo 2% e observados ao microscópio eletrônico (modelos Zeiss EM-10, EM-95 e EM-902).

Experimento 3:

Foi administrado a seis camundongos 800 mg/kg/dia do segundo extrato alcoólico de *M. ilicifolia*, via oral, durante 30 dias. O extrato foi suspenso em água destilada. Dois grupos de cinco animais cada serviram de controles. Um grupo recebeu somente água destilada, e ao outro nada foi administrado.

As demais etapas foram semelhantes às do experimento 1 e, para microscopia eletrônica, seguiu-se o protocolo descrito no experimento 2. Os cortes foram ainda corados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 2% por 15min. cada.

Experimento 4:

Foi administrado a 17 camundongos 300 mg/kg/dia do segundo extrato alcoólico de *A. millefolium*, por via oral, durante 30 dias. O extrato foi emulsionado em Tween 80 (Sigma) (51) e diluído em água destilada. A nove camundongos foi administrado somente o veículo (Tween 80 e água destilada). Eles representaram o grupo "sham". Ao grupo controle nada foi administrado. Nove dos 18 animais tratados foram mortos no dia seguinte à 30ª dose. Os demais animais foram mantidos por mais 30 dias (sem tratamento) como um grupo de recuperação.

Seguiram-se os passos do experimento 1 e, para microscopia eletrônica, os descritos no experimento 2.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados sobre o peso corporal e o peso dos órgãos reprodutores (foram considerados somente os testículos e as vesículas seminais) foram analisados pelo Teste "t" de Student, quando havia dois grupos no experimento, ou pela Análise de Variância (Teste de Duncan de Variáveis Múltiplas), quando havia três grupos. O nível de significância considerado foi de 5%.

O Teste "t" foi realizado através do procedimento PROC TTEST e a análise de variância pelo procedimento PROC GLM, do programa estatístico SAS ("Statistical Analysis System")(173). Nas análises de variância, foi feito um teste de comparações múltiplas de DUNCAN.

RESULTADOS

1. Experimento 1: *M.ilicifolia*, 200 mg/kg/dia, 20 dias

O tratamento com 200 mg/kg/dia do extrato alcoólico de *M.ilicifolia*, por 20 dias, não causou uma diferença significativa no peso corporal e no peso dos testículos e das vesículas seminais entre os animais do grupo tratado e controle, conforme é demonstrado na TAB. 1.

Os animais não mostraram sinais de intoxicação ou qualquer comportamento diferente, com exceção de um animal tratado, que, no 14º dia de experimento, cerca de 30 min. após administrar a droga, apresentou abdução dos membros posteriores, tremores, diminuição de temperatura e consequente morte.

Observando-se os animais tratados durante a dissecação, os órgãos reprodutores não diferiram dos controles, excetuando-se ao que se referia à presença de grânulos do material vegetal sobre eles e pela cavidade intraperitoneal.

Na análise histológica dos órgãos reprodutores, também não foi encontrada uma diferença significativa entre os animais tratados e os controles.

Todos os túbulos seminíferos mostraram epitélio germinativo com as células sofrendo as diferentes etapas da espermatogênese até a espermição (Fig.1). A maioria dos túbulos tinha luz vazia (Fig.2) ou com espermátides em fase de espermição somente (Fig.1), conforme o seu estágio, entretanto alguma descamação de células germinativas imaturas foi encontrada tanto em animais controles (Fig.3) como em tratados (Fig.4). Alguns túbulos seminíferos de animais controles continham muitos corpos residuais na sua luz (Fig.3).

No epitélio germinativo de animais controles e tratados, foram observados núcleos alterados na vizinhança de espermatogônias, de espermatócitos e espermátides. Esses núcleos diferiram na condensação da cromatina e consequentemente na sua coloração. Alguns núcleos na camada de espermatogônias, de espermatócitos ou de espermátides eram grandes e avermelhados e podiam ser circundados por um pouco de citoplasma (Fig.5). Eram pouco frequentes. Na posição periluminal, eram encontrados alguns núcleos do tamanho daqueles das espermátides redondas, mas com cromatina bem compactada, sendo visualizados como pequenas esferas negras (núcleos picnóticos) (Fig.6) e núcleos semelhantes aos das espermátides alongadas, mas irregulares e palidamente eosinófilos (Fig.7). Estes dois últimos tipos nucleares eram mais frequentes do que os núcleos grandes e avermelhados.

Células em metáfase (Fig.6) eram pouco frequentes, tanto em controles, como em tratados.

Em alguns túbulos seminíferos, principalmente os da periferia do testículo, tanto de animais controles como tratados, há vacuolização entre as espermatogônias (Fig. 5).

Tabela 1 - Efeito de 200mg/kg/dia (20 dias) do extrato de *M. ilicifolia* sobre o peso corporal, dos testículos e das vesículas seminais.*

	GRUPO TRATADO				GRUPO CONTROLE			
	PCI	PCF	PT	PV	PCI	PCF	PT	PV
	50	46	299,3	322,8	65	56	237,8	328,6
	58	54	280,5	282,0	50	42	305,7	621,4
	60	58	264,3	482,7	52	48	385,4	395,2
	40	45	277,8	458,9	44	43	271,2	389,5
	45	44	255,9	457,7	41	41	254,6	397,6
x±	50,6±	49,6±	275,56±	400,68±	50,4±	46±	290,94±	426,46±
SD	8,47	6,23	16,63	91,43	9,29	6,20	58,47	112,64

PCI=Peso Corporal Inicial, em g

PCF=Peso Corporal Final, em g

PT=Peso dos Testículos, em mg/100g do peso corporal

PV=Peso de uma Vesícula Seminal, em mg/100g do peso corporal

* = não há diferença significativa

Foram encontrados túbulos vacuolizados em três animais controles (um ou dois por testículo) (Fig.8) e em um animal tratado (parte de um túbulo). Em um animal controle, foi observado um túbulo só com uma camada de células germinativas e células de Sertoli.

O tecido intersticial dos testículos de animais tratados era semelhante ao dos controles, entretanto, em um animal tratado, havia regiões com muitas células de Leydig e com infiltrado linfocitário (Fig.4).

Os túbulos dos epidídimos eram densamente preenchidos por espermatozóides, com exceção daqueles da região proximal deste órgão, que, muitas vezes, estavam vazios (Fig.9). Células redondas e núcleos picnóticos estavam presentes, embora em baixa frequência, tanto em tratados (Fig.9), como em controles (Fig.10).

Num tecido conjuntivo aderido à túnica albugínea de testículos de animais tratados (Fig.11, Fig.12) e num tecido conjuntivo aderido ao epidídimo (Fig.13), foram observados macrófagos contendo grânulos esverdeados, que se pressupõe tratar-se de material vegetal. Havia também estruturas semelhantes no tecido conjuntivo que recobre o rim (Fig.14). No fígado de animais controles (onde somente o veículo foi administrado), somente o núcleo dos macrófagos era visível, e o seu limite celular era percebido indiretamente através dos hepatócitos vizinhos (Fig.15). No fígado do animal tratado, os macrófagos continham os grânulos amarelo-esverdeados, possivelmente oriundos do extrato de *M.lilicifolia* administrado (Fig.16).

Fig.1 - Corte de testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (200 mg/kg/dia), mostrando túbulo seminífero com espermatogênese normal e luz com espermatozóides somente. H/E. 400x.

Fig.2 - Corte de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *M.ilicifolia*, mostrando túbulo seminífero com espermatogênese normal e luz vazia. H/E. 400x.

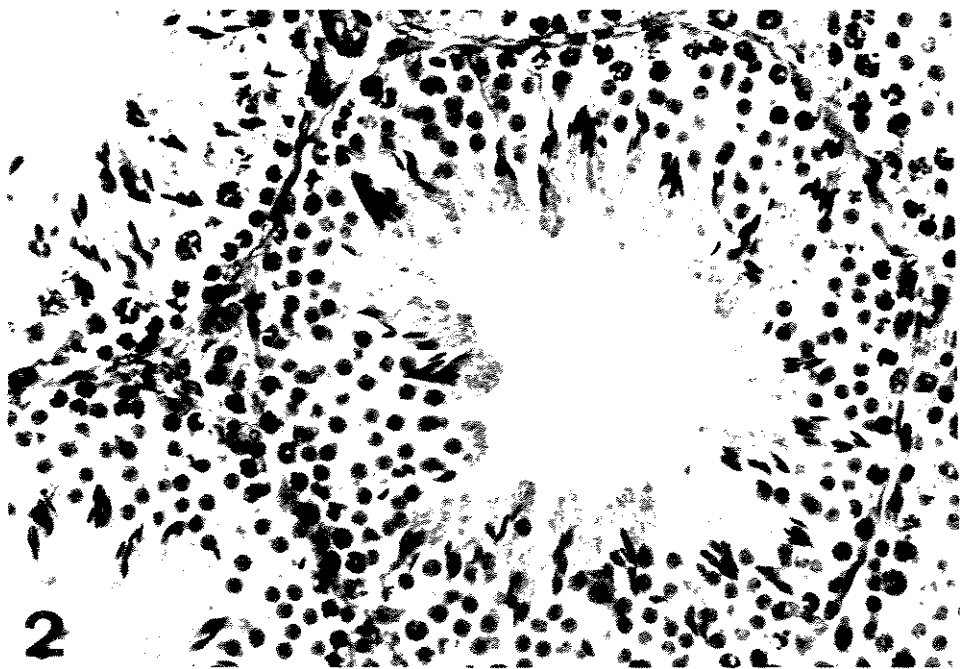
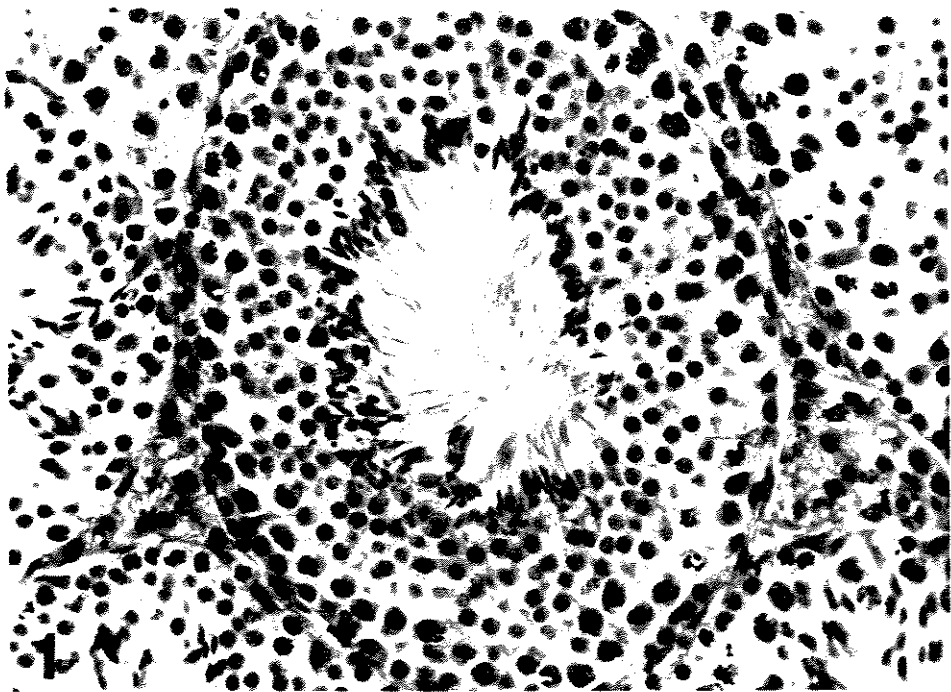


Fig.3 - Corte de testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (200 mg/kg/dia), mostrando túbulo seminífero com algumas espermatídes redondas (►) e muitos corpos residuais na sua luz (►). H/E. 400x.

Fig.4 - Corte de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *M.ilicifolia*, mostrando túbulo seminífero com células germinativas redondas na sua luz e interstício abundante com infiltrado (►). H/E. 400x.

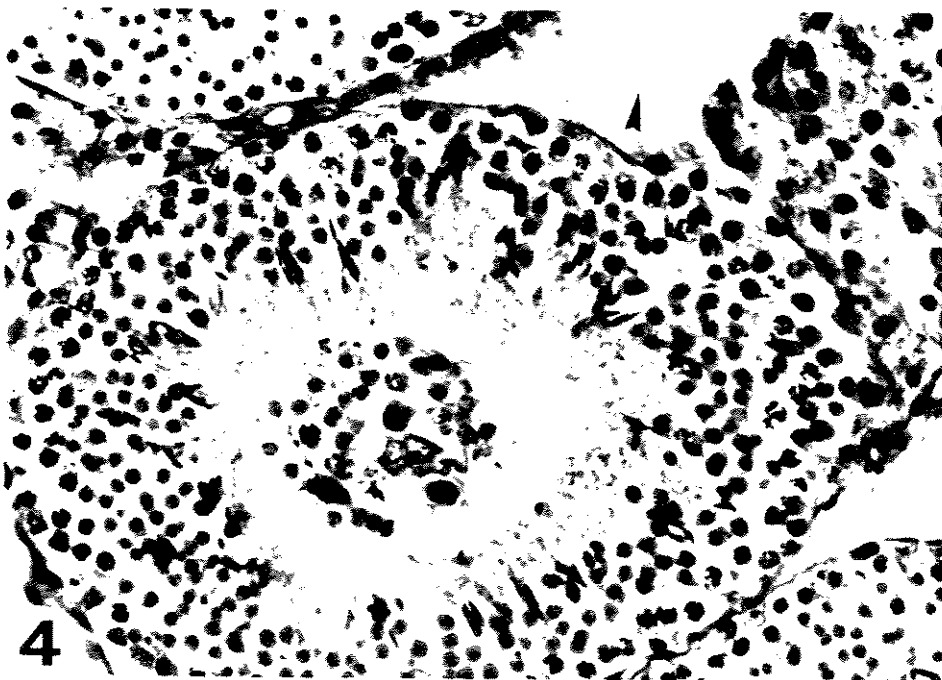
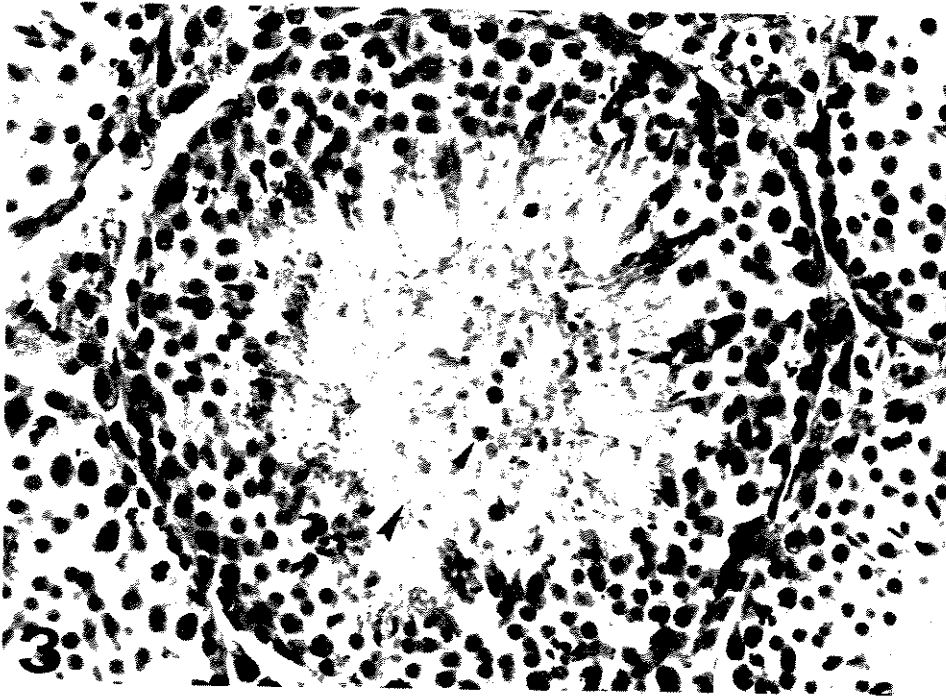


Fig.5 - Corte de testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (200 mg/kg/dia, 20 dias), onde se observam núcleos alterados (grandes e muito corados devido à compactação da cromatina) entre espermatogônias e espermatócitos (➤) e entre espermátides redondas (➤). Vacuolização entre as espermatogônias e as células de Sertoli também é demonstrada (—➤). H/E. 400x.

Fig.6 - Corte de testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (200 mg/kg/dia, por 20 dias), onde se observam núcleo picnótico (➤) e células em metáfase (—➤).H/E. 400x.

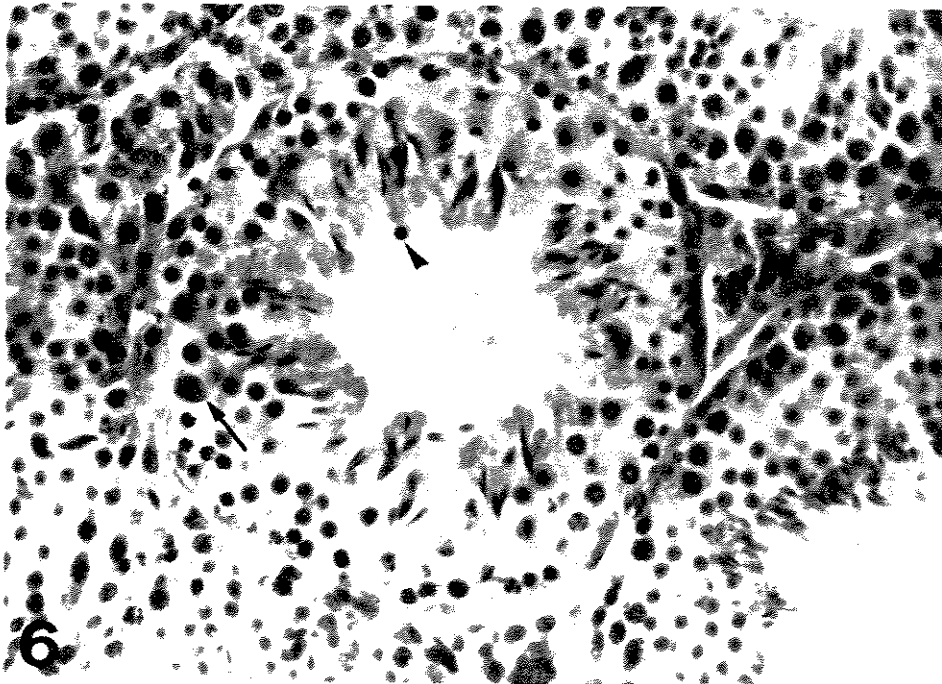
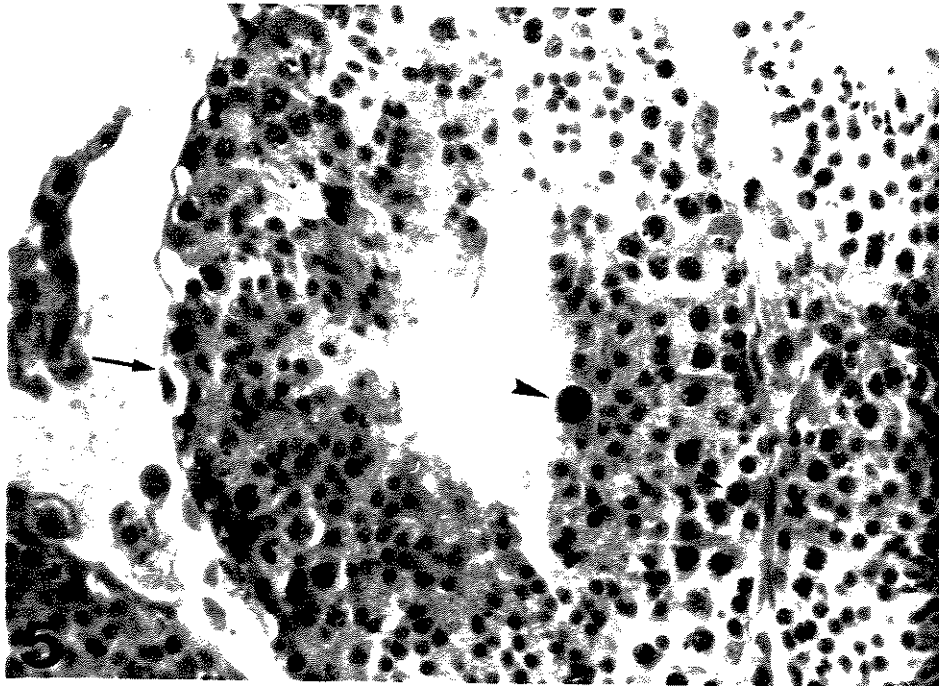
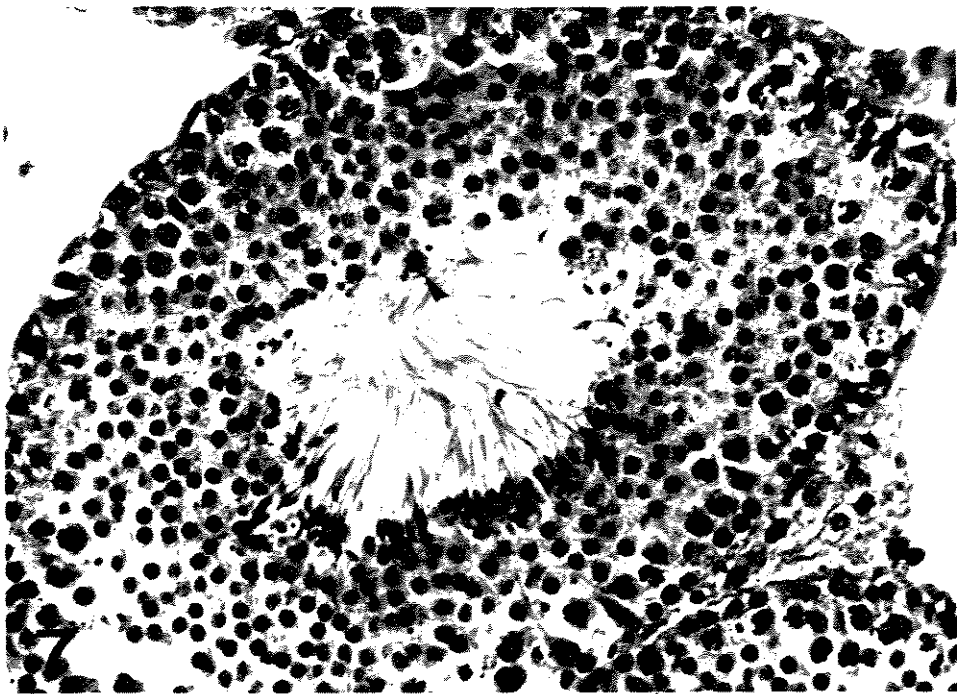


Fig.7 - Túbulo seminífero de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (200 mg/kg/dia, 20 dias) que contém núcleos irregulares, palidamente corados entre as espermatídes alongadas (➤). H/E. 400x.

Fig.8 - Corte de testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (200 mg/kg/dia, 20 dias), contendo túbulo seminífero vacuolizado (➡ ➤). H/E. 125x.



8

Fig.9 - Corte de epidídimo de animal tratado com 200mg/kg/dia, por 20 dias, de *Millicifolia*, mostrando túbulo com espermatozóides e uma célula redonda e túbulo vazio. H/E. 400x.

Fig.10-Corte do epidídimo de animal controle do experimento com *Millicifolia* (200 mg/kg/dia, por 20 dias), mostrando túbulos com espermatozóides e uma célula redonda. H/E. 400x.



- Fig.11 - Tecido conjuntivo sobre a túnica albugínea do testículo de animal tratado pelo extrato de *M.ilicifolia*, via intraperitoneal, onde se observam macrófagos com o material vegetal (➤). H/E. 400x.
- Fig.12 - Macrófagos com material vegetal do extrato de *M.ilicifolia* (➤), que foi administrado via intraperitoneal, no tecido conjuntivo sobre a túnica albugínea do testículo de animal tratado. H/E. 1000x.
- Fig.13 - Tecido conjuntivo sobre o epidídimo, contendo macrófagos com grânulos do extrato de *M.ilicifolia*, administrado via intraperitoneal (➤). H/E. 400.
- Fig.14 - Tecido conjuntivo sobre o rim, contendo macrófagos com grânulos do extrato de *M.ilicifolia*, administrado via intraperitoneal (➤). H/E. 400x.

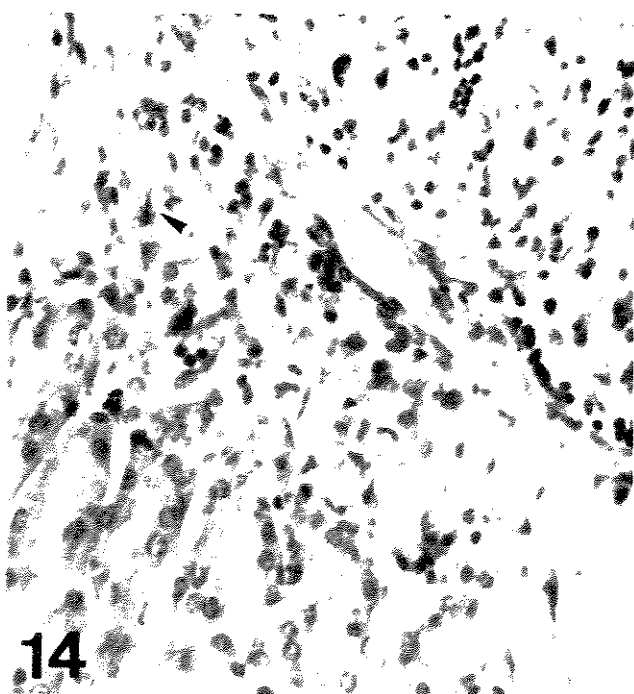
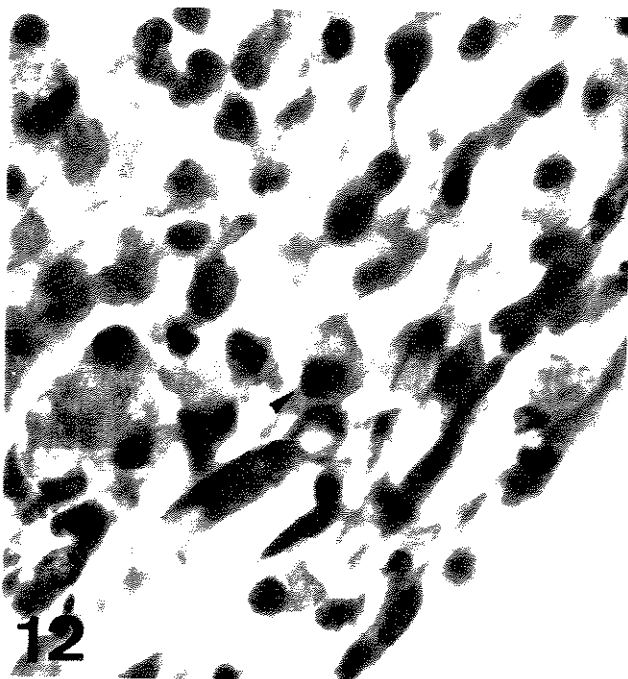
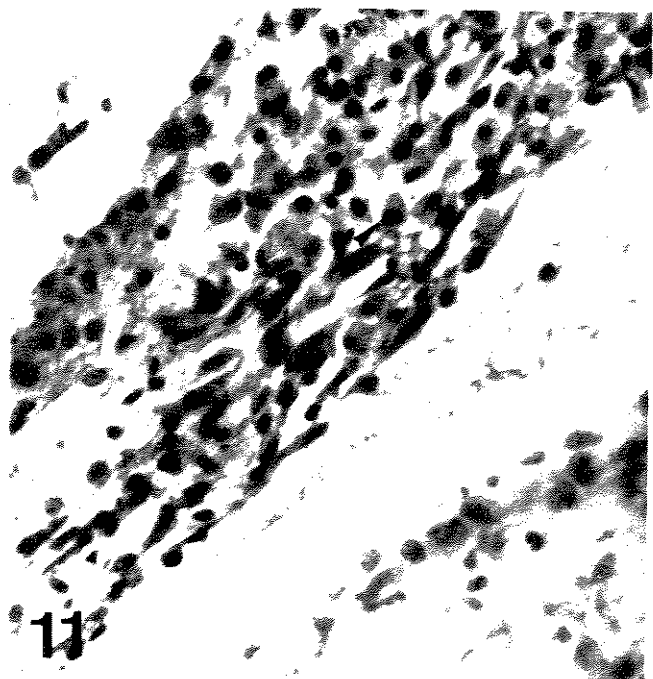
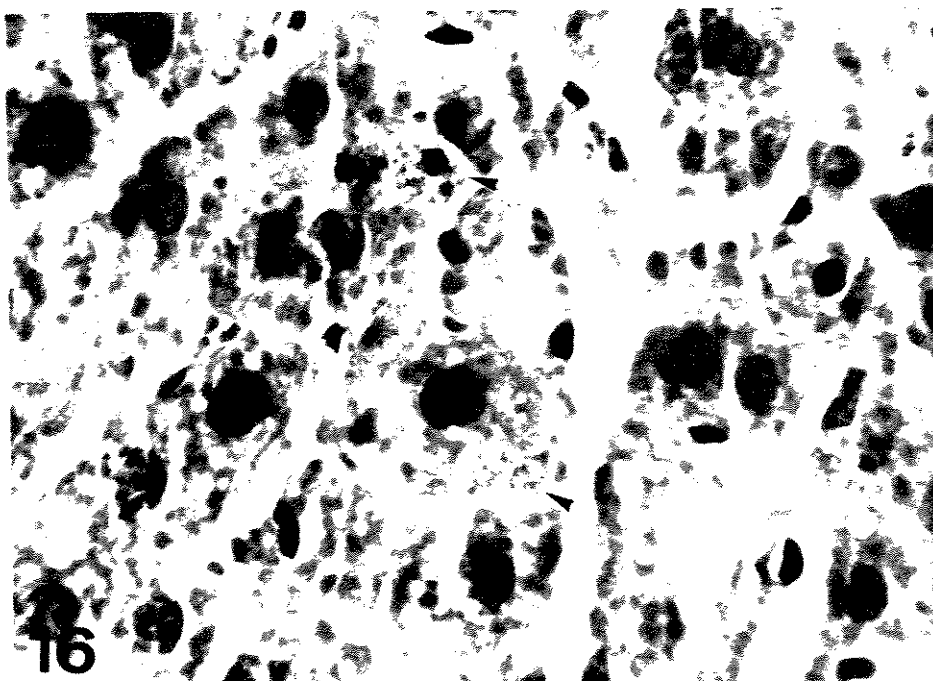
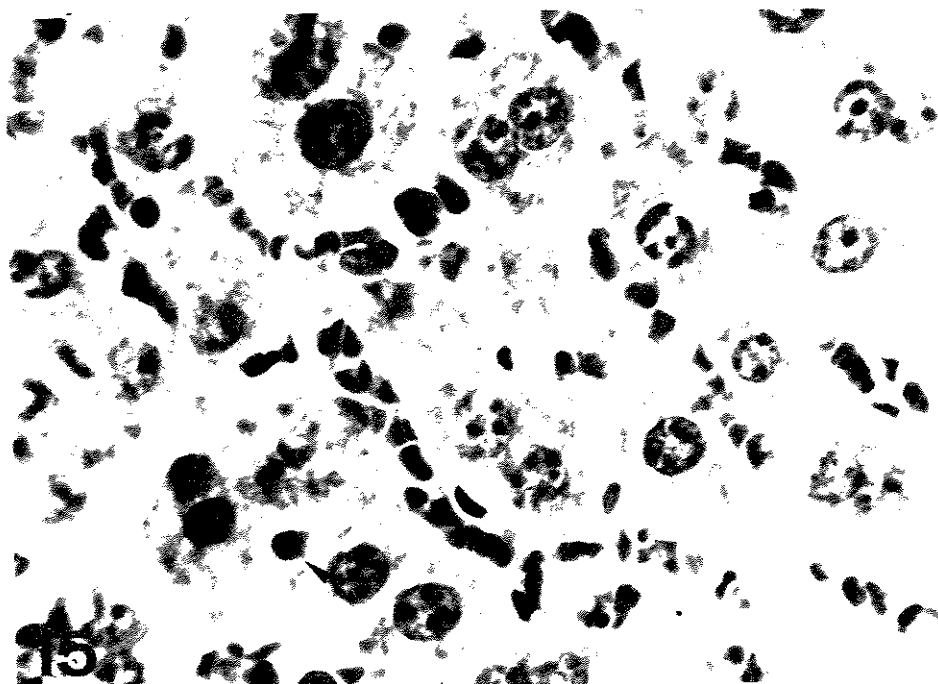


Fig.15 - Corte do fígado de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (200 mg/kg/dia), mostrando hepatócitos e células de Kupffer (➤) normais. H/E. 1000x.

Fig.16 - Corte do fígado de animal tratado com 200 mg/kg/dia de *M.ilicifolia*, mostrando macrófagos com partículas do material vegetal (➤). H/E. 1000x.



2. Experimento 2: *A.millefolium* 200 mg/kg/dia, por 20 dias

A.millefolium, numa dose de 200 mg/kg/dia, por 20 dias, não provocou diferenças significativas no peso corporal e no peso dos testículos e das vesículas seminais entre os animais tratados e controles, conforme é demonstrado na TAB. 2.

Durante o experimento, foram observados comportamentos diferentes do normal nos animais tratados.

Dois animais controles foram tirados do experimento no 17º dia. Um animal apresentava pieloeção, edema abdominal e diarreia, e outro apresentou hematúria.

Dois animais morreram durante o tratamento com o extrato de *A.millefolium*: um, após o 6º dia, e outro, após o 16º. Esses animais apresentaram, durante o tratamento, pieloeção e contorções abdominais. Outro animal, apresentando esses sintomas, foi retirado do experimento no 17º dia.

Foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos reprodutores de alguns animais tratados. Num animal, eles eram maiores e apresentavam coágulos de sangue. Uma das vesículas seminais era rudimentar. Noutro, as vesículas não foram achadas, possivelmente por serem rudimentares ou por estarem encobertas pelos coágulos. Aparentemente o aumento e a deformação dos órgãos reprodutores eram devidos à presença de membranas que os envolviam e à vasodilatação. Os testículos dos animais tratados diferiram dos controles pela coloração rósea, devida à vasodilatação.

A análise morfológica mostrou que, nos animais do grupo controle, a luz dos túbulos seminíferos continha somente espermatozóides (Fig.17) ou algumas células germinativas imaturas (Fig.18), enquanto os túbulos seminíferos dos animais tratados foram severamente afetados. Esses continham células das primeiras fases da espermatogênese ocupando sua luz, podendo até mesmo não ser perceptível o seu limite (Fig.19) ou provocar uma diminuição da espessura do epitélio germinativo (Fig.20).

Ainda com relação à estrutura dos túbulos seminíferos de animais tratados foram observadas células gigantes, densamente eosinófilas (Fig.19) no epitélio e na luz, numa frequência maior do que nos controles e do que nos animais do experimento com *M.lilicifolia*. Estas células devem corresponder a células germinativas das primeiras fases da espermatogênese que degeneraram. Semelhante ao experimento anterior foram observados núcleos picnóticos e núcleos irregulares, palidamente corados.

Algumas células em metáfase foram visualizadas nos túbulos seminíferos de animais tratados.

Os epidídimos dos animais controles continham principalmente espermatozóides na sua luz

Tabela 2 - Efeito de 200 mg/kg/dia (20 dias) do extrato de *A. millefolium* sobre o peso corporal e o peso dos testículos e das vesículas seminais.*

GRUPO TRATADO						GRUPO CONTROLE					
PCI	PCF	PT	PV	PCI	PCF	PT	PV	PCI	PCF	PT	PV
36	37	374,	1297,3	39	39	474,6	279,2	36	37	474,6	279,2
36	36	256,4	-	37	37	289,3	253,0	38	40	332,6	535,9
39	41	335,6	489,	39	37	350,0	365,5	39	39	253,6	477,2
44	41	264,9	359,5	37	39						
39	40	295,5	334,5								
x±SD	38,67±2,94	39,17±2,14	312,77±47,83	571,06±410,28	38±1	38,2±1,09	340,02±84,12	382,16±122,71			

PCI=Peso Corporal Inicial, em g

PCF=Peso Corporal Final, em g

PT=Peso de um Testículo, em mg/100 g de peso corporal

PV=Peso de uma Vesícula Seminal, em mg/100 g de peso corporal

*=não há diferença significativa

(Fig.21). Eram poucas as células redondas. Os epidídimos dos animais tratados, entretanto, continham mais dessas células. Devido à esfoliação de células germinativas imaturas nos túbulos seminíferos, sugere-se que as células redondas presentes no epidídimo eram germinativas. Entretanto um neutrófilo e um eosinófilo foram reconhecidos (Fig. 22).

Ao microscópio eletrônico, visualizou-se um grande espaço entre as espermatogônias e as células de Sertoli (Fig.23) nos animais tratados. Nos animais controles, isto não foi observado. (Fig.24).

Nas células de Sertoli, tanto em animais tratados como em controles, foram observadas figuras mielínicas, corpos densos e corpos multivesiculares (Fig.23, 24 e 25). No citoplasma de algumas células germinativas, foram vistas "lamelas anulatas", uma estrutura membranosa, com complexos de poro (Fig.25 e 26).

Espermátides jovens uninucleadas-interligadas (em comunicação por uma ponte citoplasmática) e espermátides multinucleadas foram encontradas, tanto em animais controles (Fig.27, Fig.28), como em tratados (Fig.29).

Corpo cromatóide, uma estrutura constituída de RNAm de reserva, pertencente a uma espermátide, é mostrado na Fig. 28.

As mitocôndrias das células germinativas possuem uma aparência típica, dada pelas suas cristas curtas (Fig. 29).

Nas Fig.27, 28 e 29, é possível visualizar espermátides no final da fase capuz, quando a vesícula acrossômica já se achatou sobre o núcleo. Numa espermátide (Fig.29), devido ao ângulo do corte realizado, é possível visualizar o acrossomo envolvendo totalmente a região anterior do núcleo. O grânulo acrossômico está presente no interior dessa vesícula (Fig.29).

A formação do acrossomo também é mostrada nas Fig. 30 e 31. Na Fig. 30, tem-se uma espermátide no início da fase capuz, quando uma vesícula do Golgi, contendo o grânulo pro-acrossômico, adere-se ao núcleo. Material denso é depositado nesta região. Na Fig. 31, a cabeça da espermátide foi cortada transversalmente, permitindo a visualização da vesícula acrossômica e do material elétron-denso circundando o núcleo, apesar de não completamente.

Nas Fig. 32 e 33, observam-se os microtúbulos auxiliando o processo de alongamento das cabeças das espermátides.

Uma imagem incomum das espermátides foi encontrada num animal tratado (Fig.34). As espermátides estavam envoltas por porções de citoplasma altamente vacuolizado e algumas não estavam inseridas nas células de Sertoli. Essa imagem difere da que é geralmente encontrada (Fig.35), onde as espermátides estão inseridas no citoplasma das células de Sertoli. As cabeças das espermátides, quando alongadas, tem seu citoplasma reduzido; no máximo, na sua base, fica retida a gota citoplasmática (Fig. 36).

Na Fig. 36, pode-se observar o formato de foice da cabeça da espermátide, característica dos roedores. A região do flagelo visível na fotografia é a peça intermediária, constituída pelo axonema, fibras densas e mitocôndrias.

As imagens de peças intermediárias geralmente mostram o axonema, as fibras densas e as mitocôndrias ao redor, entretanto foram vistas mitocôndrias não organizadas em torno do axonema (Fig. 37, Fig.38). Alguns deles, em um animal controle, não continham o número normal de microtúbulos (9 duplas periféricas) e de fibras densas (9)

- Fig.17 - Corte de testículo de animal controle do experimento de *A.millefolium*, mostrando túbulo seminífero com espermatogênese normal e luz com espermatozóides somente. H/E. 400x.
- Fig.18 - Túbulo seminífero do controle do experimento com *A.millefolium* (200mg/kg/dia, por 20 dias) com descamação de algumas células para a luz, mas com epitélio mantendo sua espessura e com espermatogênese normal. H/E. 450x. ►

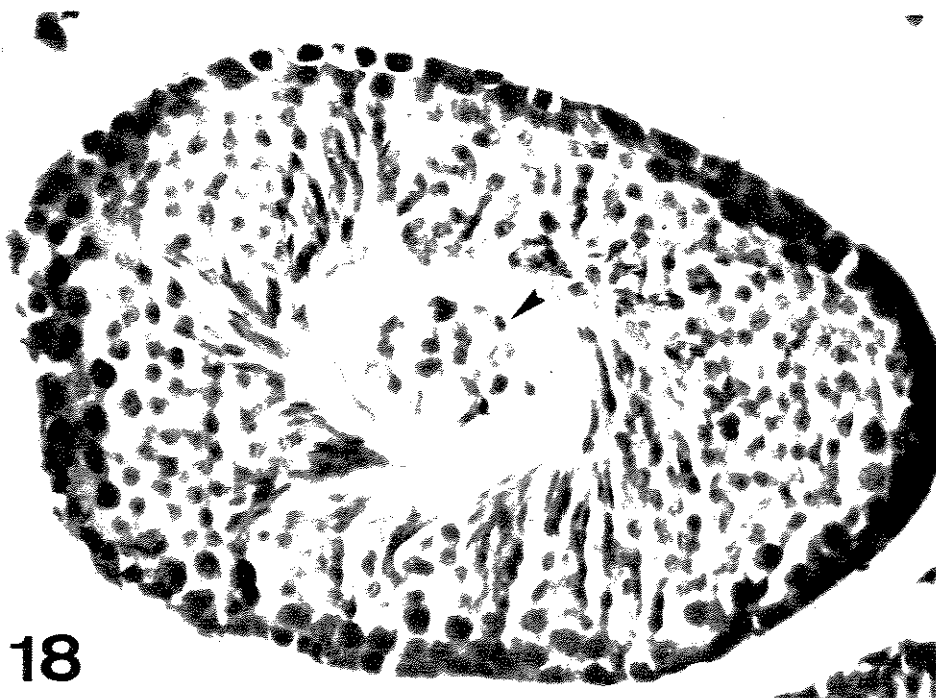
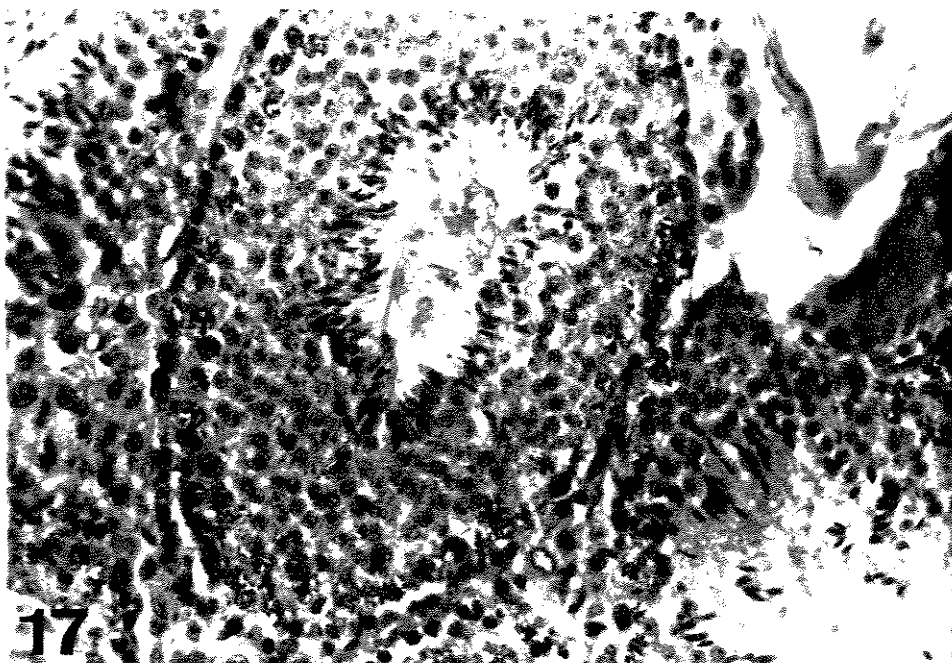
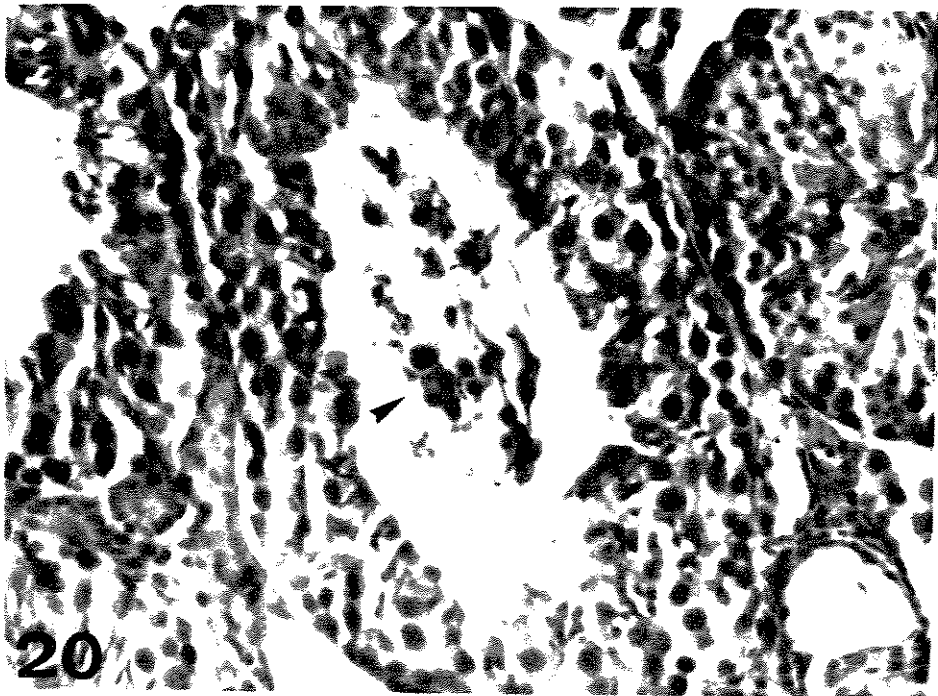
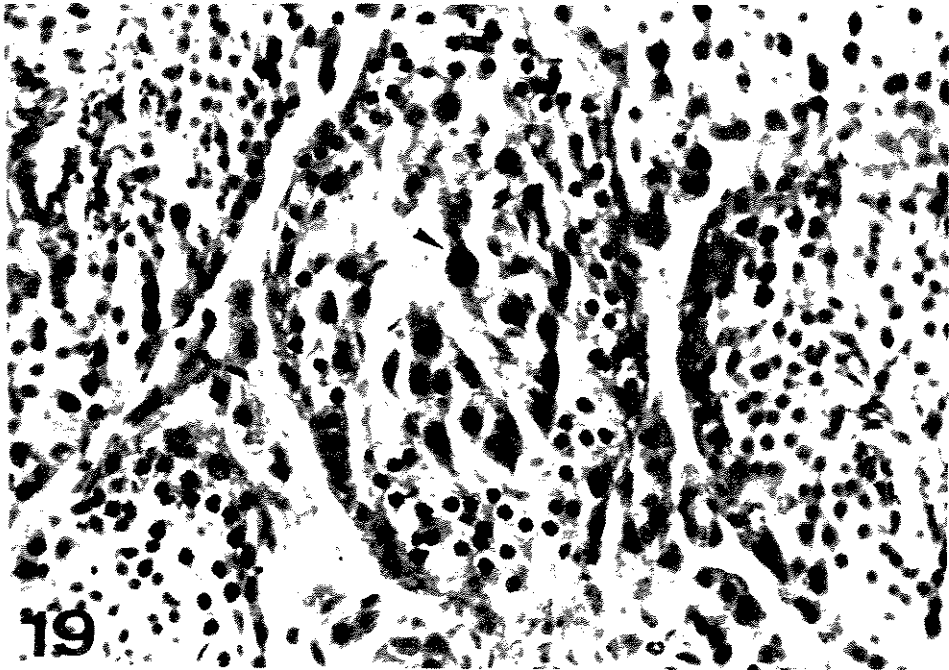


Fig.19 - Corte de testículo de animal tratado com 200mg/kg/dia, por 20 dias, com *A.millefolium*, mostrando túbulo seminífero sem luz bem delimitada devido à presença de células das primeiras fases da espermatogênese (➤). H/E. 450x.

Fig. 20 - Corte de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia do extrato de *A.millefolium*, por 20 dias, mostrando túbulo seminífero com redução no epitélio germinativo e descamação de células deste para a luz (➤). H/E. 400x.



- Fig.21 - Corte de túbulo do epidídimo de animal controle do experimento com *A.millefolium*, (200 mg/kg/dia, por 20 dias), cujo interior contém exclusivamente espermatozóides(ε). H/E. 1000x.
- Fig.22 - Corte de túbulo do epidídimo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *A.millefolium*, cujo interior, além dos espermatozóides, contém células germinativas imaturas e um neutrófilo (➤). H/E. 1000x.

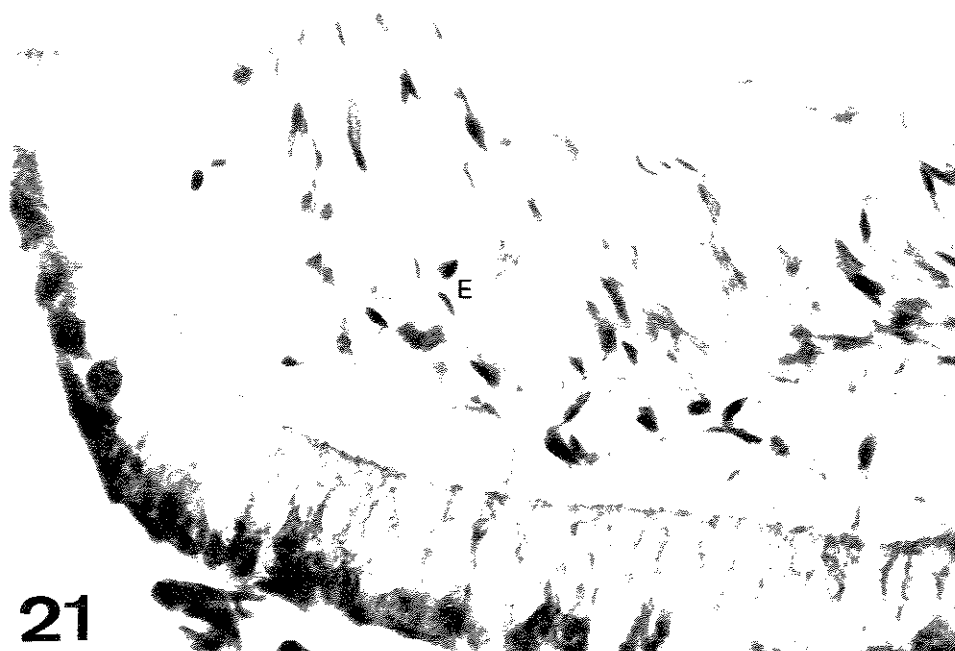


Fig.23 - Corte ultrafino observado ao microscópio eletrônico de um fragmento do testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *A.millefolium*, mostrando grande espaço entre as espermatogônias (E) e as células de Sertoli (S). Corpos densos (➤) e figuras de mielina (➤) estão presentes. 4000x.

Fig.24 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com *A.millefolium* (200 mg/kg/dia, por 20 dias), onde se observam espermatogônias (E), células de Sertoli (S) e células mióides (M). Grande corpo denso (possivelmente uma gotícula de lipídio) no citoplasma da célula de Sertoli é encontrado (➤). 4800x.

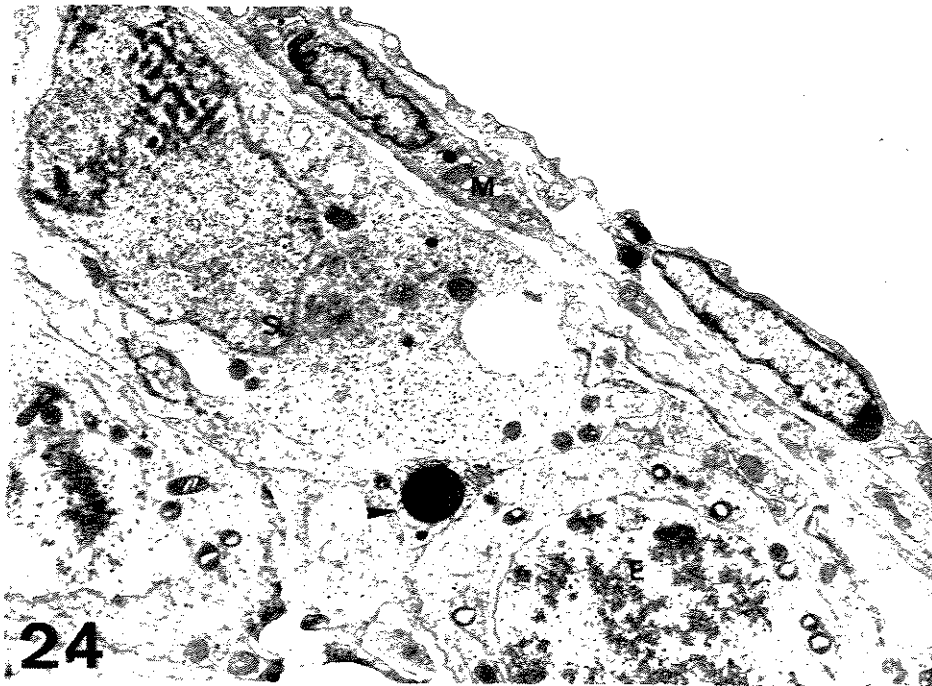
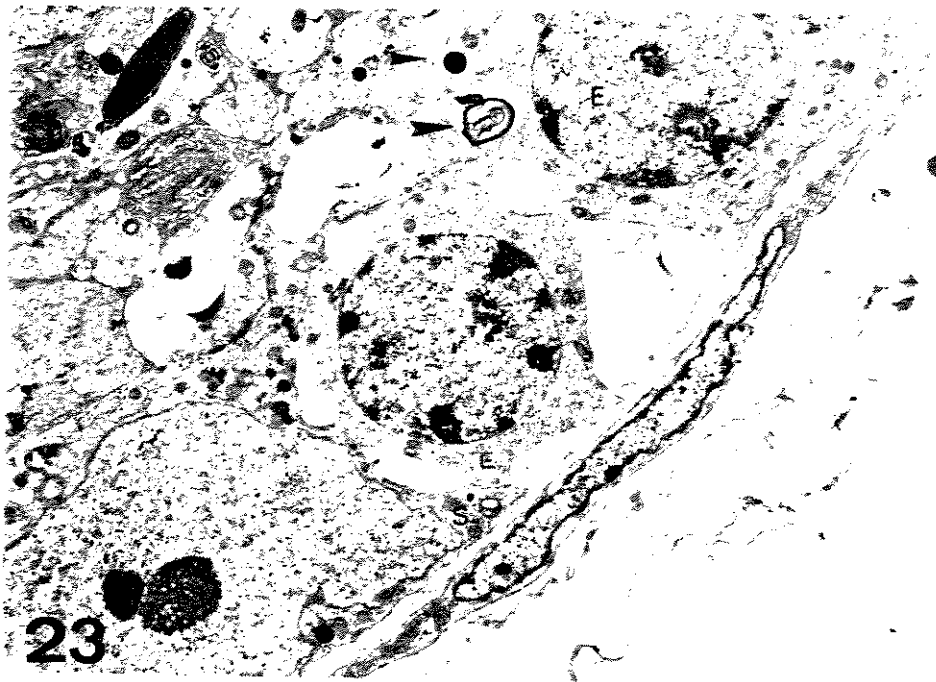
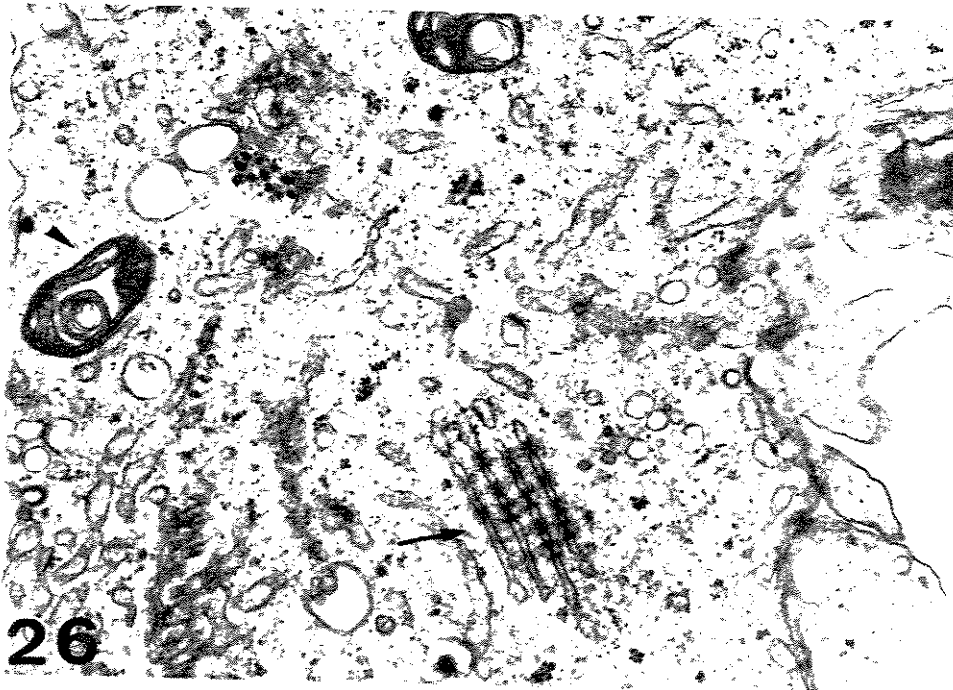
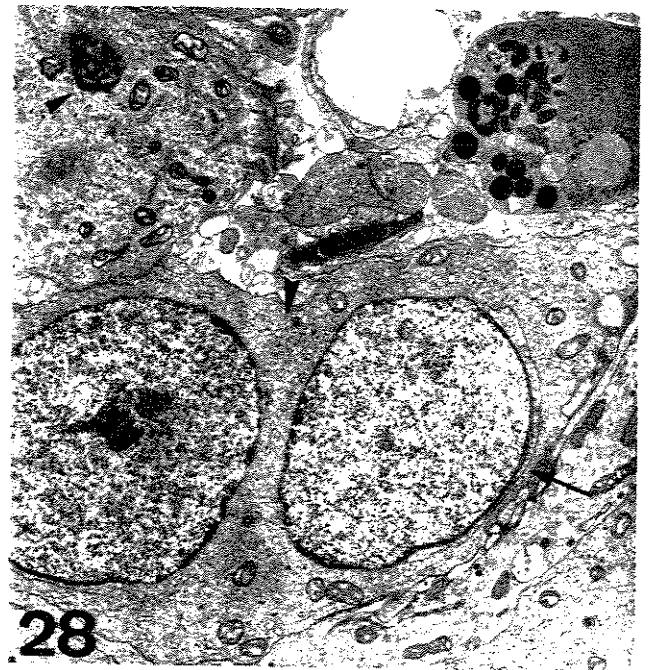
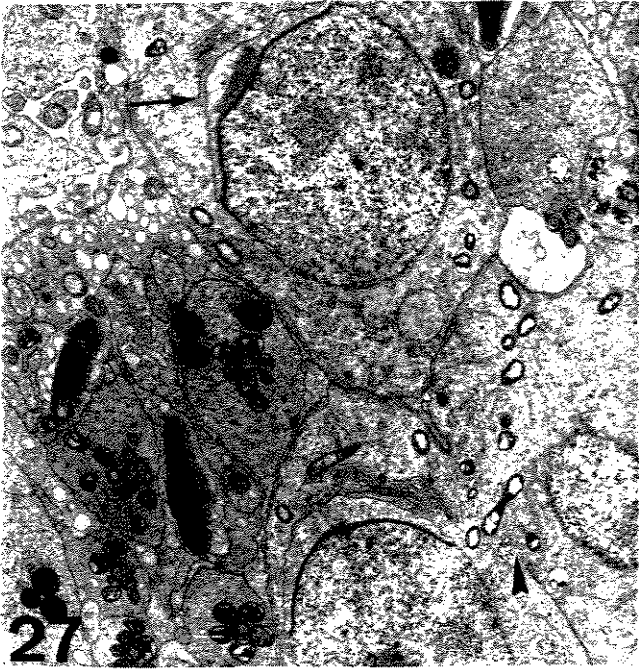


Fig.25 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia de *A.millefolium*, por 20 dias, que mostra corpos multivesiculares (►), *lamela anulata* (—►) e axonema envolto de mitocôndrias (►). 16000x.

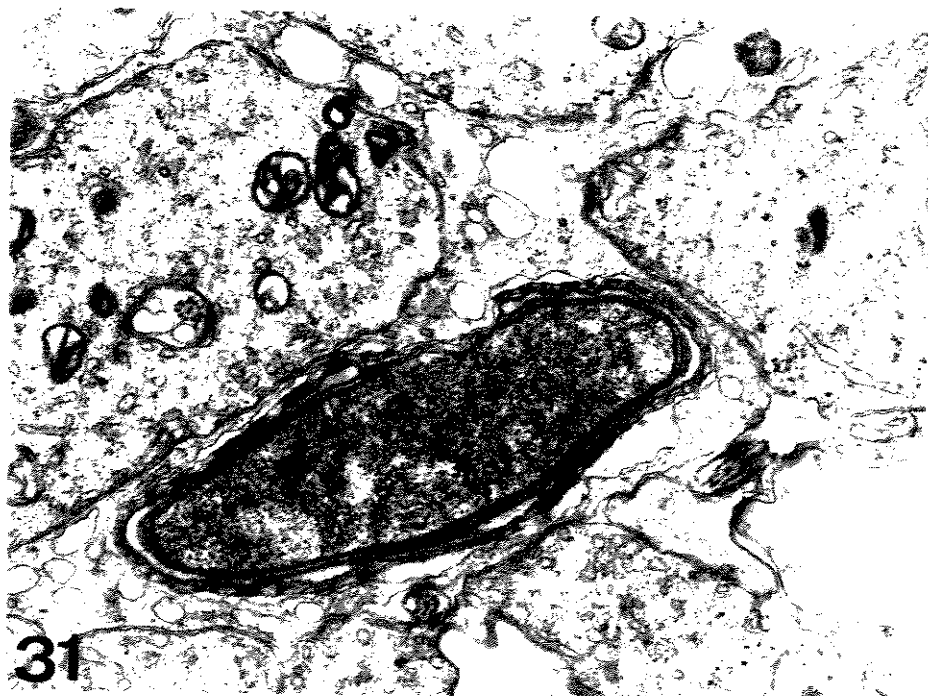
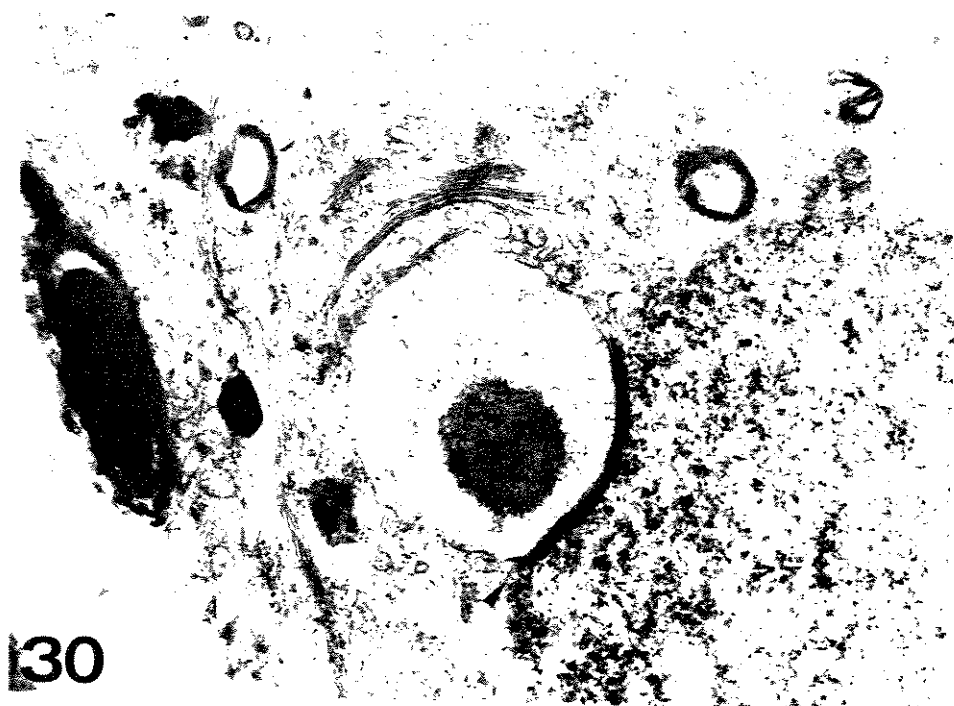
Fig.26 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com *A.millefolium* (200 mg/kg/dia), que mostra *lamela anulata* (—►) e mitocôndrias (►). 19200x.



- Fig.27 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com **A.millefolium** (200 mg/kg/dia), onde se observam espermatídes redondas uninucleadas interligadas (➤) e capuz acrossômico (➡). 4500x.
- Fig.28 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com **A.millefolium** (200 mg/kgdia), onde se observam espermatíde redonda multinucleada (➤) e corpo cromatóide (➤). Capuz acrossômico é apontado (➡).4500x.
- Fig.29 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de **A.millefolium**, onde se observam espermatídes uninucleadas interligadas (➤), capuz acrossômico sobre o núcleo de uma destas (➡) e outro com grânulo acrossômico visível, envolvendo a porção anterior de outro núcleo (➡). A mitocôndria de aspecto típico das células germinativas é apontada (➤). 4800x.



- Fig.30 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado, onde é possível visualizar a formação do acrossomo (➤) a partir de uma vesícula do Golgi, contendo o grânulo proacrossômico. 19000x.
- Fig.31 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *A.millefolium*, que apresenta um corte transversal pela cabeça de uma espermátide alongada, permitindo a visualização da vesícula acrossômica e do material elétron-denso depositado sob esta. 12800x.



- Fig.32 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com *A.millefolium* (200 mg/kg/dia), onde são observados microtúbulos ao redor da cabeça de uma espermátide em alongamento (➤). 5100x.
- Fig.33 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *A.millefolium*, mostrando microtúbulos ao redor da cabeça da espermátide em alongamento (➤). 8500 x.
- Fig.34 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *A.millefolium*, onde se observam cabeças de espermátides envolvidas por porções de citoplasma altamente vacuolizado e ausência do citoplasma das células de Sertoli. 5100x.
- Fig.35 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de *A.millefolium*, que tem cabeças de espermátides não envolvidas por citoplasma como na figura anterior e inseridas no citoplasma das células de Sertoli. 6800x.

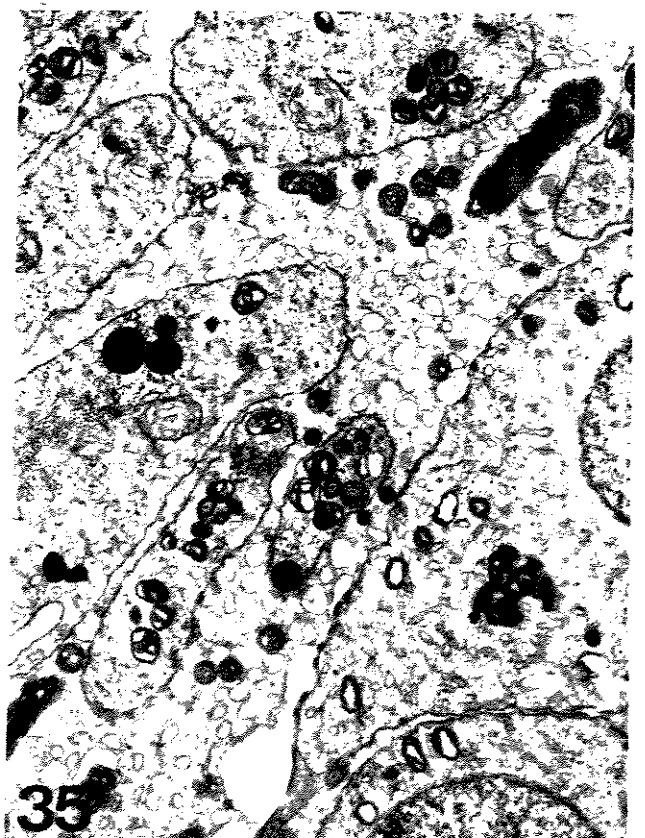
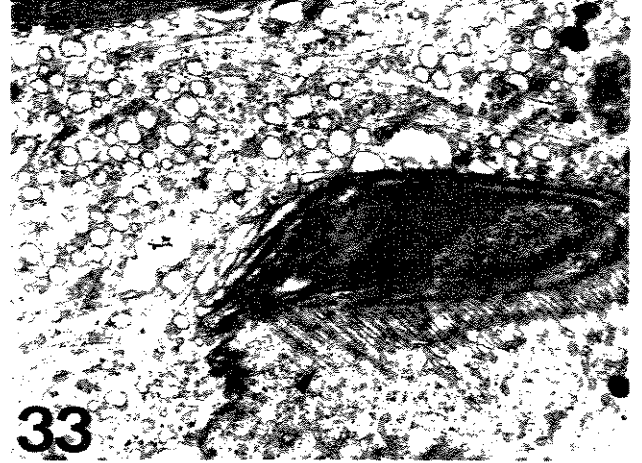
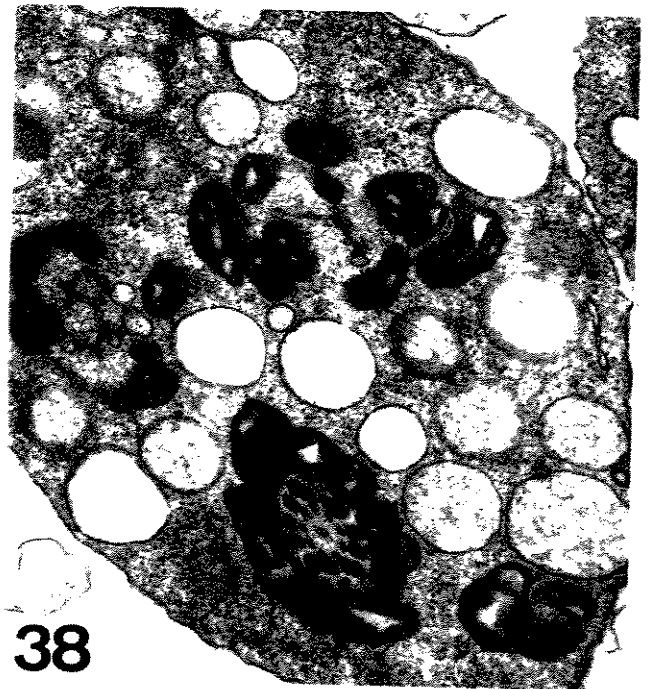
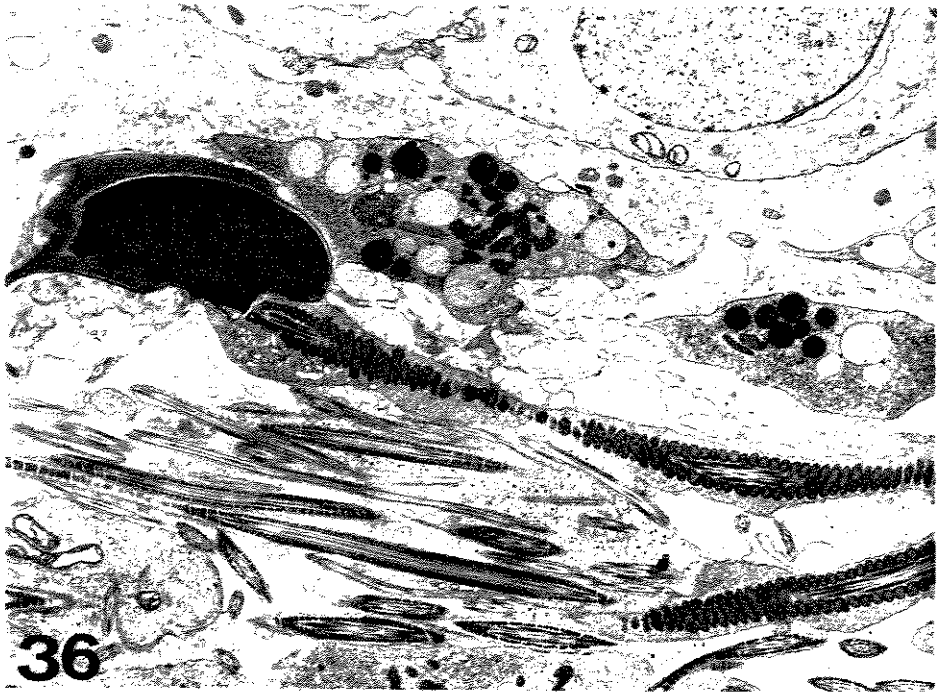


Fig.36 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com **A.millefolium** (200 mg/kg/dia), que contém uma espermatíde alongada cortada longitudinalmente. 5100x.

Fig. 37 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com **A.millefolium** (200 mg/kg/dia), onde são visíveis peças intermediárias alteradas: ausência de alguns microtúbulos e de algumas fibras densas e desorganização das mitocôndrias. 11900x.

Fig. 38 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 200 mg/kg/dia, por 20 dias, de **A.millefolium**, onde são observados dois conjuntos de mitocôndrias que não se organizaram em peças intermediárias e uma peça intermediária normal. 19800x.



3. Experimento 3: *M. illicifolia*, 800 mg/kg/dia, por 30 dias

No experimento com 800 mg/kg/dia do extrato alcoólico de *M. illicifolia*, por 30 dias, foi obtida uma diferença significativa entre animais tratados e controles ao que se refere ao peso corporal, mas não em relação ao peso dos testículos e das vesículas seminais, conforme é demonstrado na TAB. 3.

Durante o experimento, os animais não mostraram sinais de intoxicação ou qualquer comportamento fora do padrão, entretanto grande e rápida perda de peso corporal foi medida em dois animais tratados.

Ao serem dissecados não foram observadas, macroscopicamente, alterações nos órgãos internos.

Na análise morfológica, foram encontrados alguns túbulos seminíferos com células redondas na sua luz, tanto em controles (Fig. 39), como em tratados (Fig.40). Estes túbulos eram mais comuns próximos ao local onde foi cortada a porção para microscopia eletrônica. Entretanto, como se pode ver nestas mesmas figuras, os túbulos seminíferos geralmente continham espermátides em fase de espermição.

Alguns túbulos vacuolizados foram vistos na periferia de testículos de animais tratados (Fig.40) e de animais do grupo "sham" (Fig.41) e controle (Fig.42).

Alguna vacuolização em torno das espermatogônias foi observada (tanto em controles como em tratados).

Algumas células alteradas foram encontradas no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos. Estas células apresentavam núcleos grandes, intensamente eosinófilos, com ou sem citoplasma e eram encontradas próximas à luz dos túbulos seminíferos de animais tratados (Fig.43) e, ocasionalmente, de "sham" (Fig.44). Eram ausentes nos controles (Fig.45). Núcleos picnóticos próximos à luz, na vizinhança das espermátides redondas, foram observados em testículos de animais tratados e, com menor frequência, em controles. Núcleos irregulares, palidamente corados, possivelmente pertencentes a espermátides em alongamento, foram vistos em alguns túbulos seminíferos de animais "sham" e controles (Fig. 46). Um núcleo grande, pouco corado, próximo à luz de um túbulo seminífero de animal "sham", também foi observado (Fig.44).

Uma célula multinucleada, gigante foi encontrada na luz de um túbulo seminífero, em corte longitudinal, de um animal controle (Fig.47). Noutro, uma estrutura com grânulos basófilos foi observada (Fig.48).

Pouquíssimas células em metáfase estavam presentes no epitélio germinativo de animais controles e tratados.

Tabela 3 - Efeito de 800 mg/kg/dia do extrato de *M. ilicifolia* sobre o peso corporal e o peso dos testículos e das vesículas seminais.*

	GRUPO TRATADO				GRUPO "SHAM"				GRUPO CONTROLE			
	PCI	PCF	PT	PV	PCI	PCF	PT	PV	PCI	PCF	PT	PV
	61	58	203,4	356,9	56	55	240,	437,2	54	55	301,8	434,5
	58	49	291,8	434,7	54	51	274,5	437,2	51	52	271,1	219,2
	60	46	352,2	247,8	57	56	216,1	469,6	45	47	316,3	467,3
	67	61	234,4	436,1	57	55	232,7	463,6	50	47	288,0	450,
	57	55	256,4	498,2	57	55	192,7	492,7	47	50	237,5	577,1
	52	47	310,6	527,7								
x	59,17	52,66	274,8	416,9	56,2	54,4	231,2	468,62	49,4	50,2	282,9	429,62
+SD	±4,96	±6,22	±54,09	±101,75	±1,3	±1,9	±30,3	±20,7	±3,5	±3,4	±30,4	±130,7

PCI=Peso Corporal Inicial, em g

PCF=Peso Corporal Final, em g

PT=Peso de um Testículo, em mg/100 g de peso corporal

PV=Peso de uma Vesícula Seminal, em mg/100 g de peso corporal

*= a análise de variância foi significativa ($F=8,15$; $p=0,005$) para a diferença de peso corporal entre grupo tratado e os grupos "sham" e controle

Muitos túbulos da cabeça do epidídimo (região proximal deste órgão) estavam vazios. Entretanto aqueles do corpo e da cauda estavam densamente preenchidos por espermatozóides. Células redondas foram observadas no epidídimo de todos os animais (Fig.49, Fig.50). Células alongadas, com núcleo numa extremidade, lembrando as células colunares do epitélio desse órgão, eram as mais comuns nos controles (Fig.50). Algumas células bi ou multinucleadas também foram encontradas.

Ao microscópio eletrônico, foram observados grandes espaços em torno das espermatogônias nos túbulos seminíferos de animais tratados (Fig.51) e de animais controles (Fig.52).

Foram encontrados corpos densos (possivelmente gotículas lipídicas) de grande tamanho nas células de Sertoli de animais tratados (Fig.51). Nos animais controles, eles eram bem menores.

Espermátides redondas de animais tratados apresentavam acrossomos bastante dilatados e de formato incomum (Fig.53) em relação àqueles de espermátides de animais controles e "sham" (Fig.54).

O núcleo da cabeça das espermátides alongadas de animais tratados era bem mais vacuolizado que o dos controles, incluindo os "sham", nos quais a vacuolização geralmente se restringia a um ponto elétron-lúcido (Fig.53, 54, 55, 56 e 57). Projeções posteriores do núcleo dessas células, possivelmente oriundas do envoltório nuclear, foram observadas nos animais tratados (Fig.53 e 55). Nos animais do grupo controle e "sham" (Fig.54, 56 e 57) e nos animais dos experimentos anteriores, estas projeções não foram identificadas.

Fig. 39 - Corte de testículo de animal "sham" do experimento com 800mg/kg/dia de *M.ilicifolia*, por 30 dias, mostrando alguns túbulos seminíferos com células redondas na luz (➤). H/E. 100x.

Fig.40 - Corte de testículo de animal tratado com 800 mg/kg/dia (30 dias) de *M.ilicifolia*, onde se observam túbulos seminíferos com células redondas na luz (➤) e túbulos vacuolizados (➤). H/E. 100x.

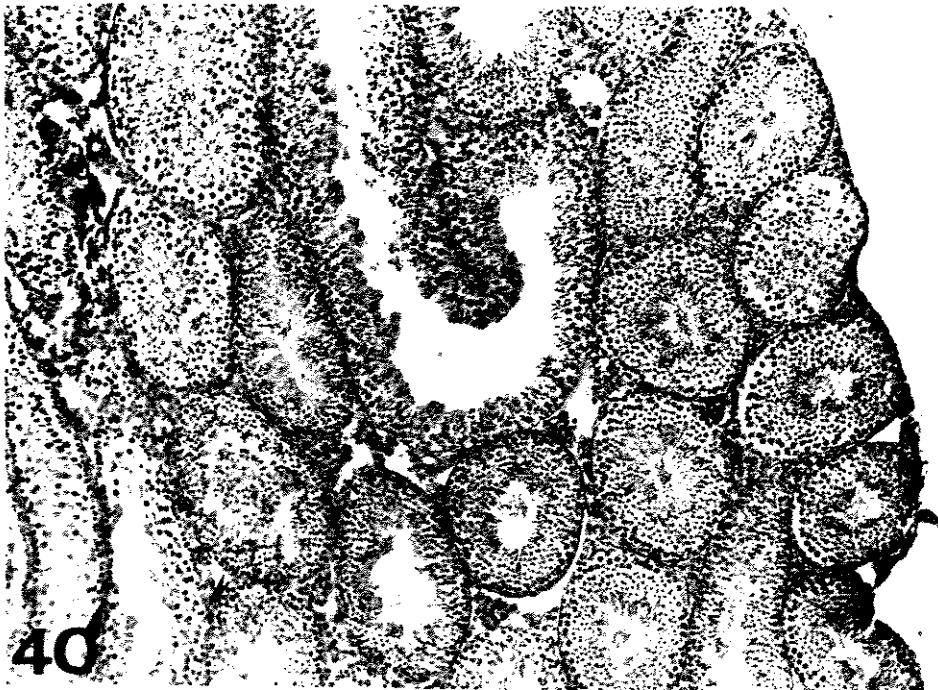
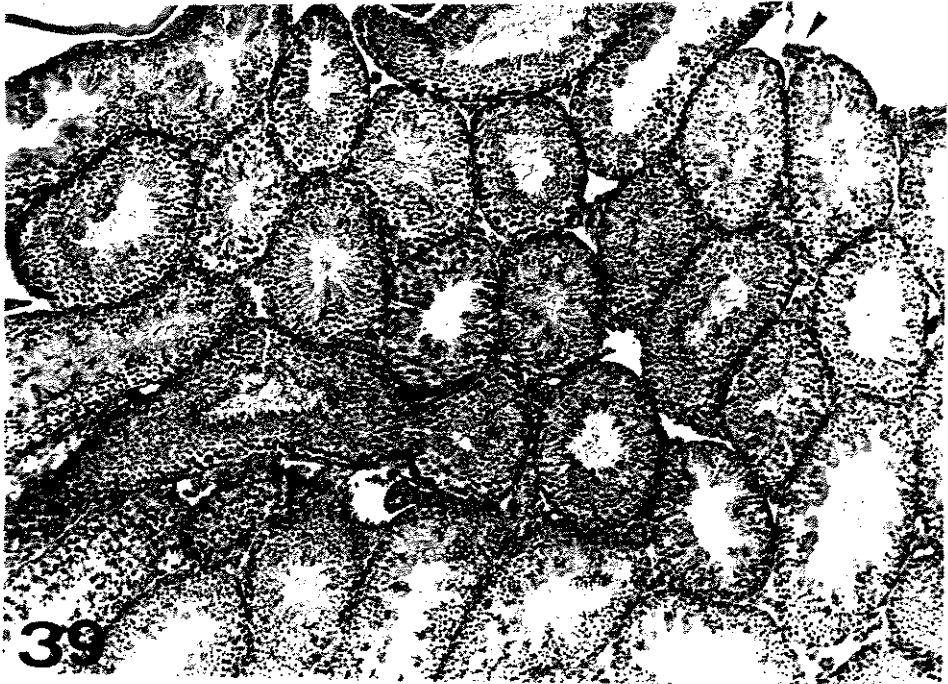


Fig.41 - Corte de testículo de animal "sham" do experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia), onde túbulos vacuolizados são mostrados. H/E. 400x.

Fig.42 - Corte de túbulo seminífero vacuolizado encontrado num testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia). H/E. 400x.

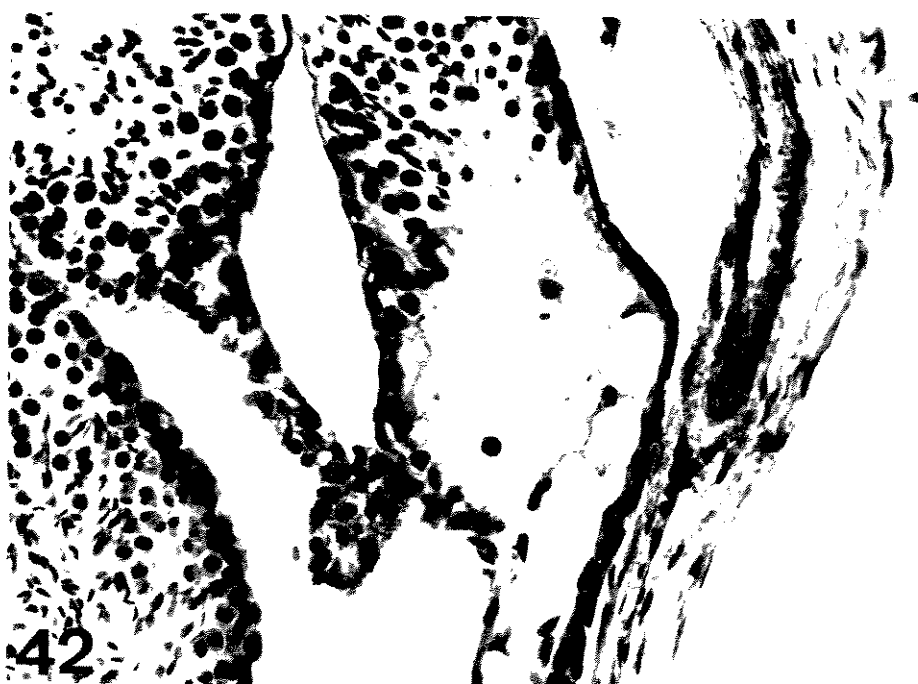
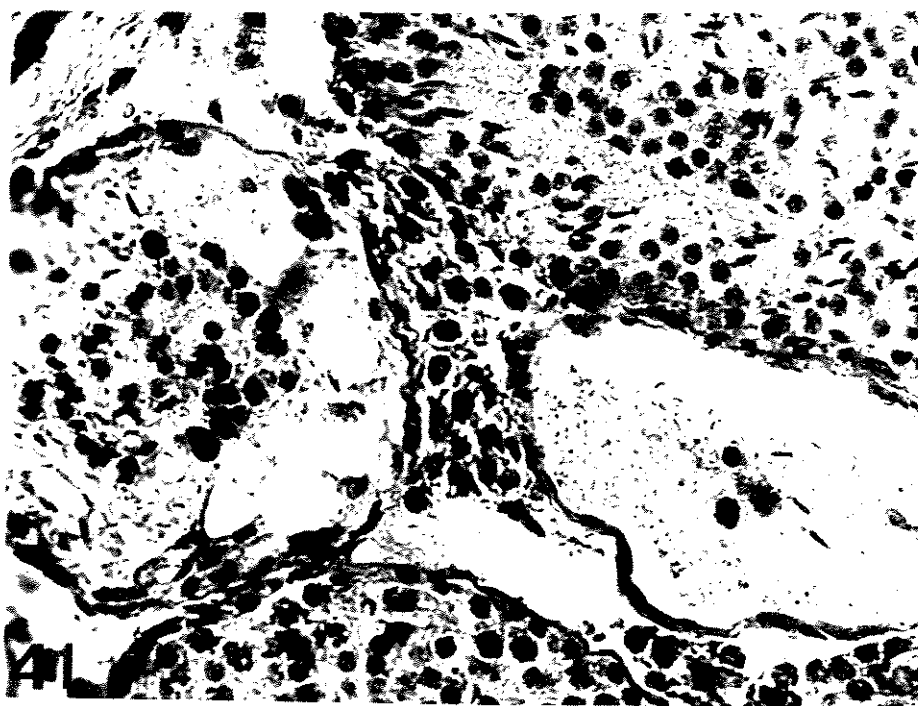


Fig.43 - Corte de testículo de animal tratado com 800 mg/kg/dia de *Milicifolia* , por 30 dias, onde são visíveis células alteradas, avermelhadas e com núcleos grandes, próximas à luz dos túbulos seminíferos (➤). H/E. 400x.

Fig.44 - Túbulo seminífero em corte longitudinal, de animal "sham" do experimento com *Milicifolia*, 800 mg/kg/dia, 30 dias, mostrando uma célula alterada, com núcleo grande e avermelhado (➤) e outra com núcleo palidamente corado (➤). H/E. 400x.

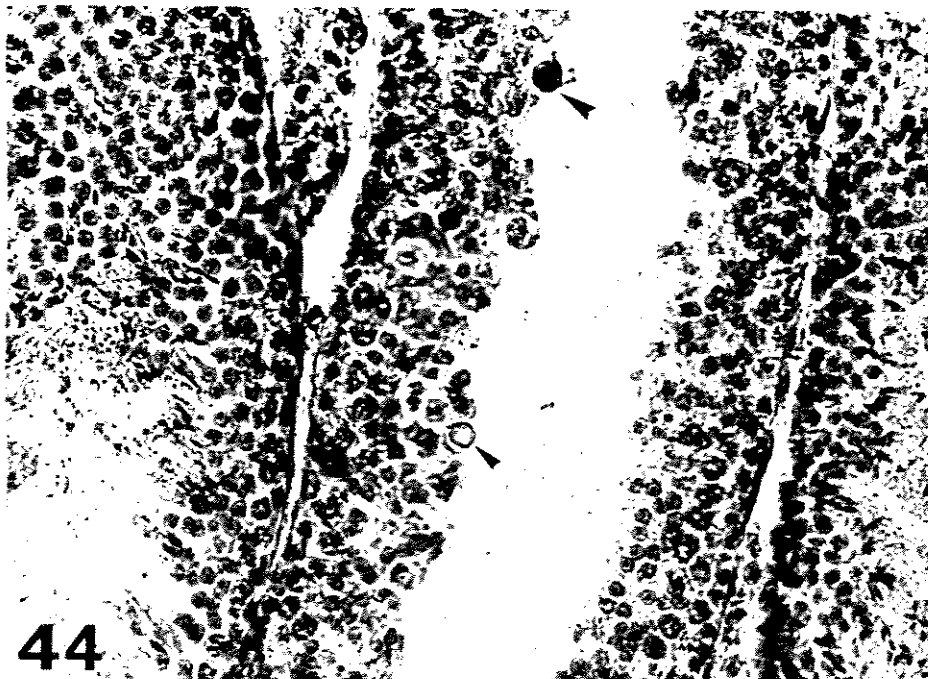
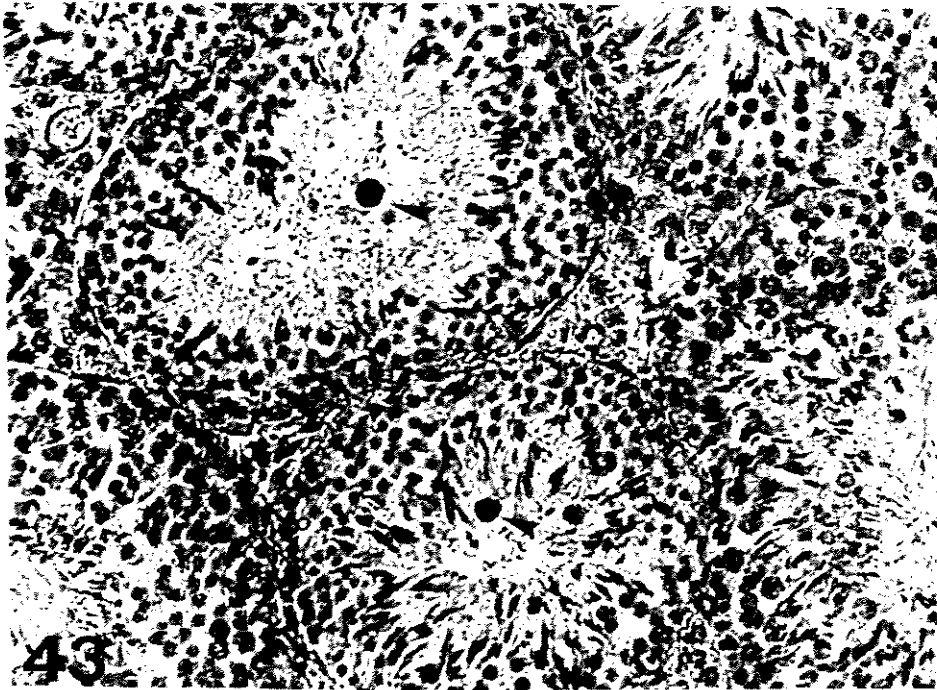


Fig.45 - Corte de testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia*, 800 mg/kg/dia, por 30 dias, mostrando túbulo seminífero normal, em espermição. H/E. 400x.

Fig.46 - Túbulo seminífero de animal "sham" do experimento com *M.ilicifolia*, 800 mg/kg/dia, que contém núcleos palidamente corados e irregulares na camada periluminal (►). H/E. 400x.

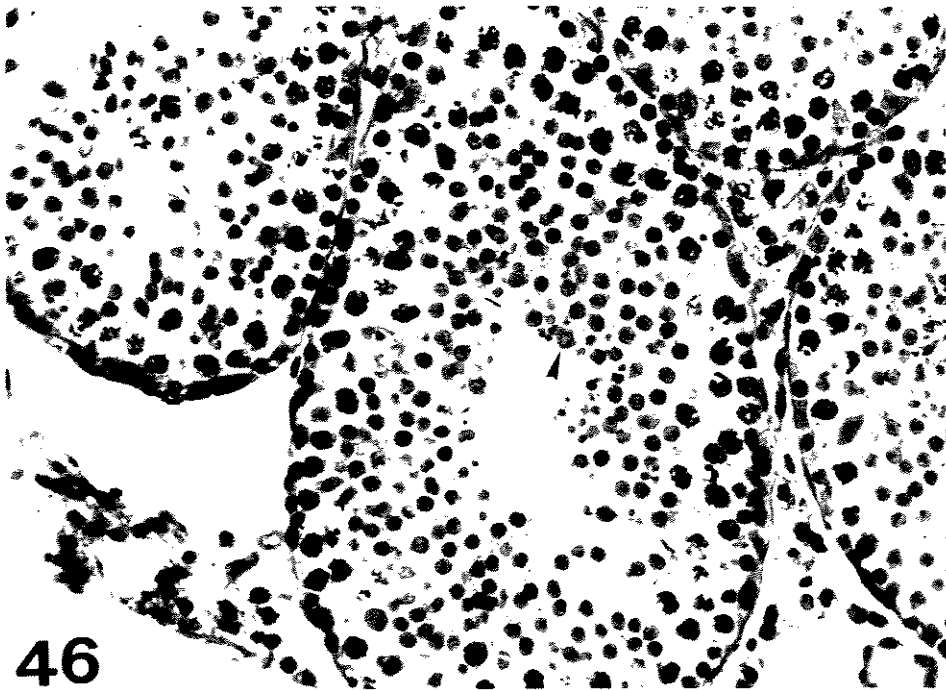
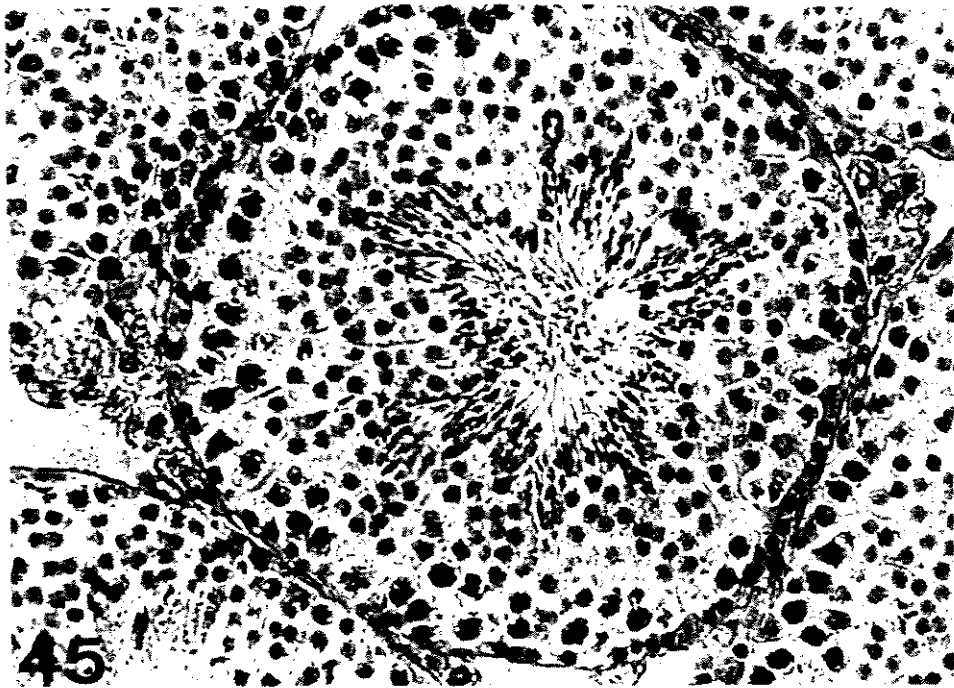


Fig.47 - Túbulo seminífero de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (800mg/kg/dia, 30 dias), contendo uma célula gigante multinucleada na sua luz. H/E. 400x.

Fig. 48 - Túbulo seminífero de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia), com uma célula gigante, com grânulos basófilos na sua luz. H/E. 400x.

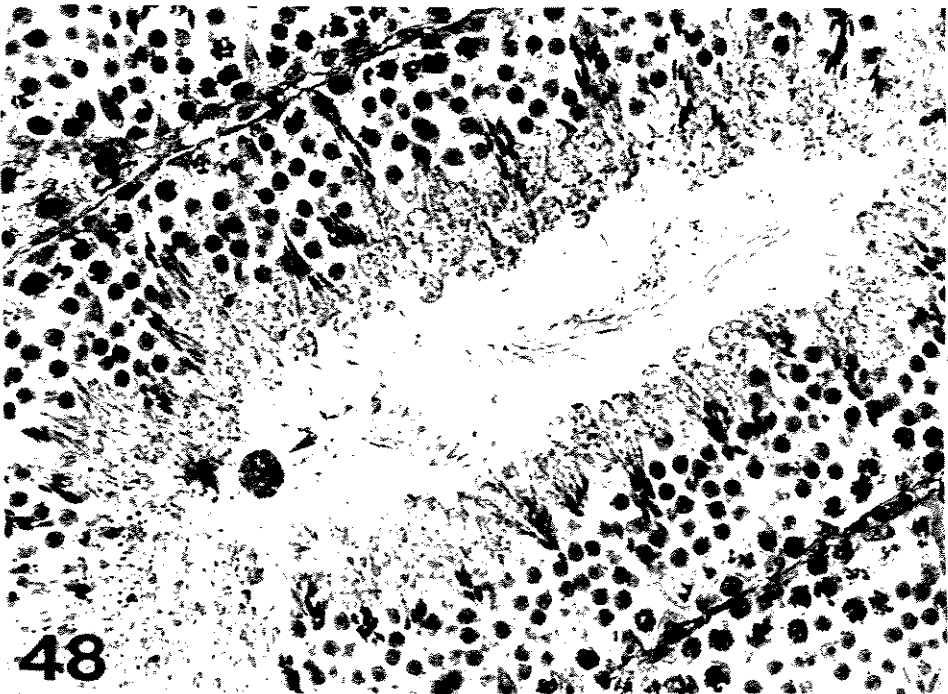
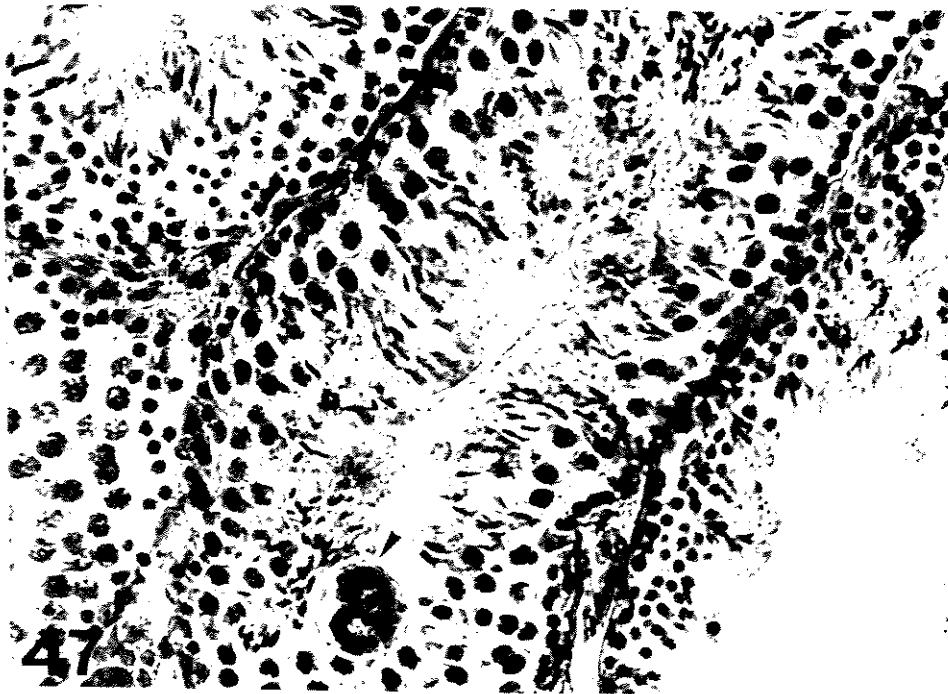
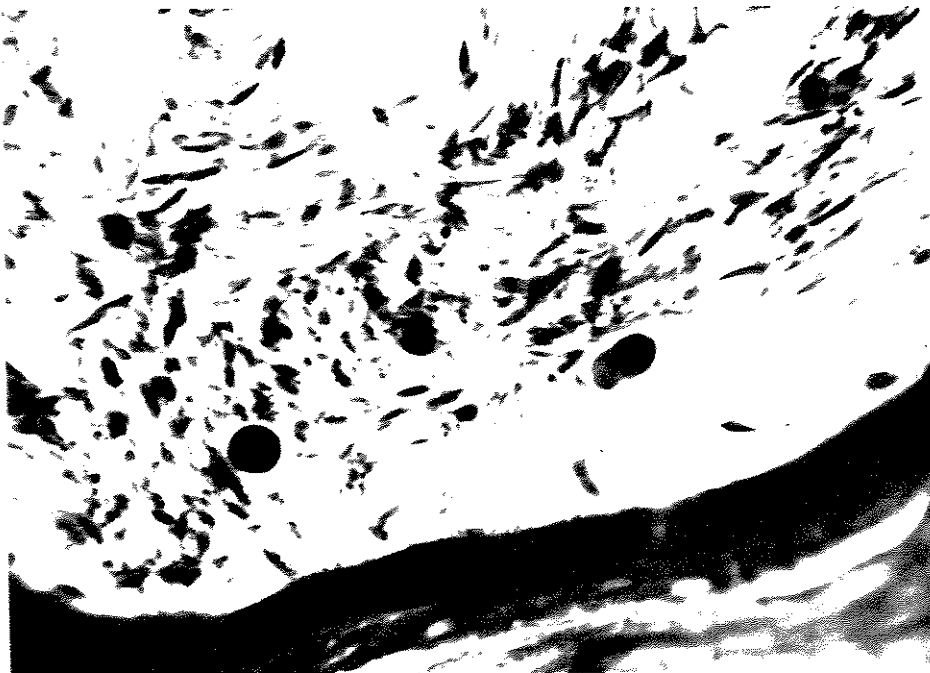
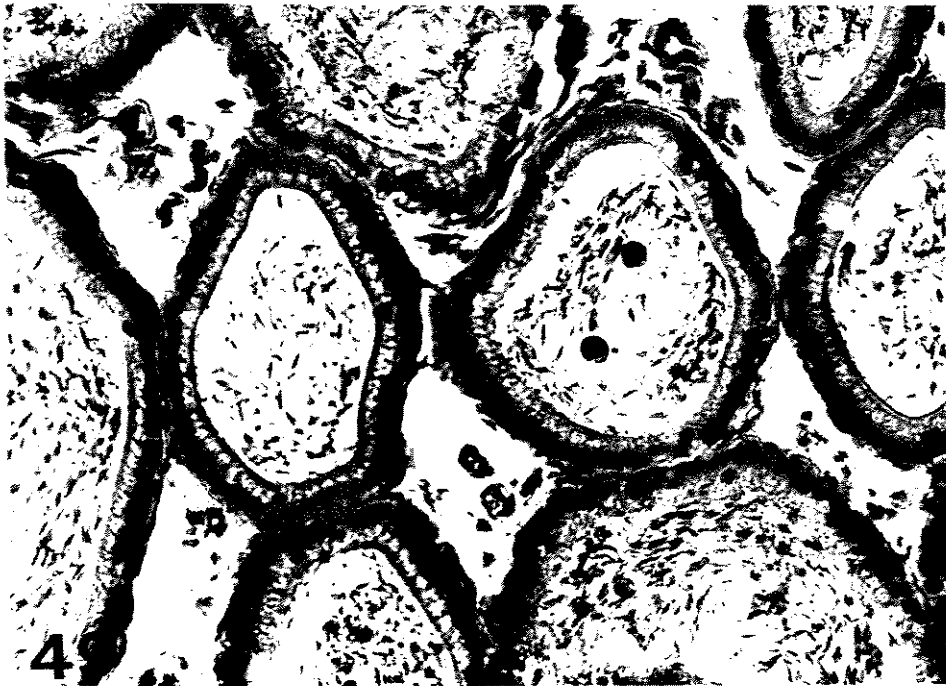
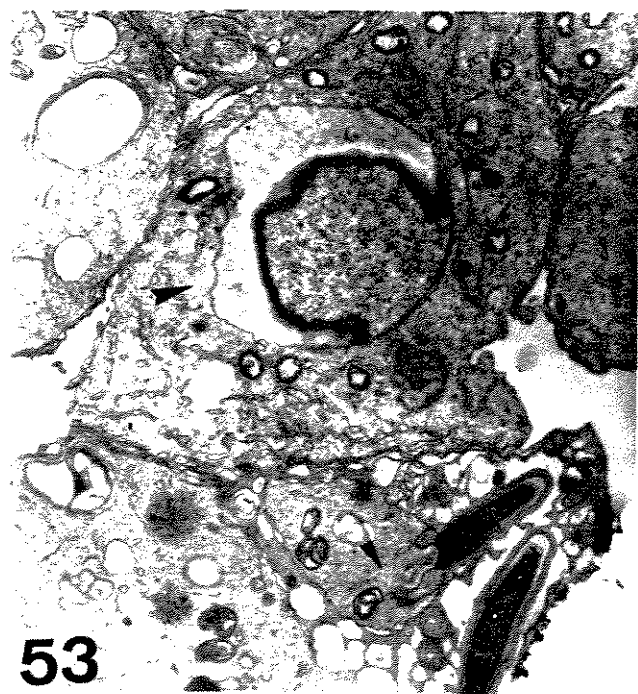
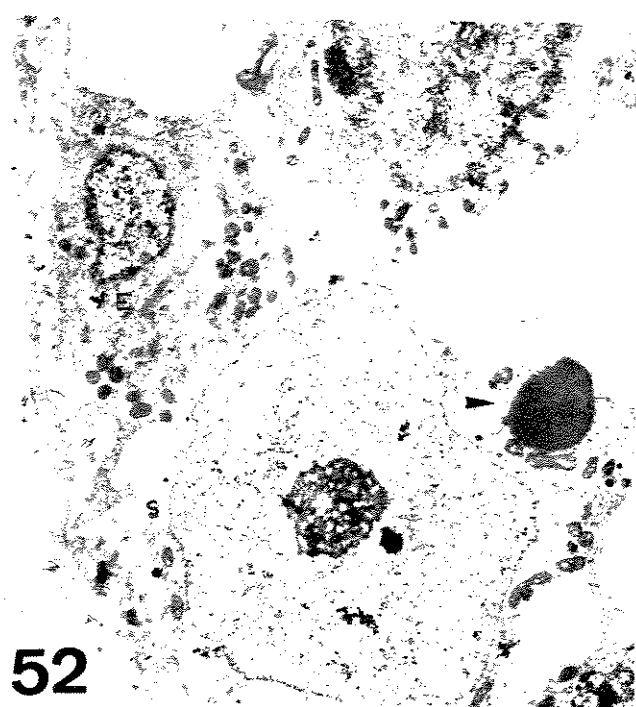
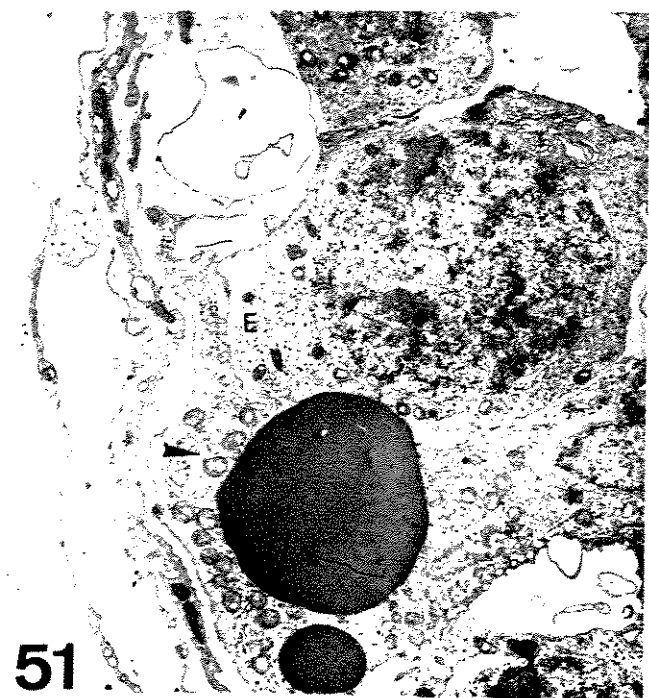


Fig.49 - Túbulo de epidídimo de animal tratado do experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia, 30 dias), com células redondas na sua luz além dos espermatozóides. H/E. 400x.

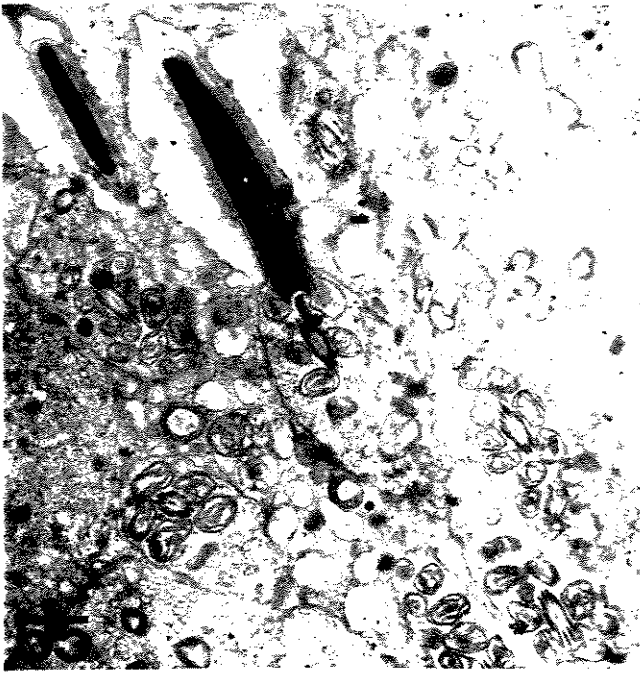
Fig.50 - Túbulo de epidídimo de animal "sham" do experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia), mostrando células redondas e uma com citoplasma alongado. H/E. 1000x.



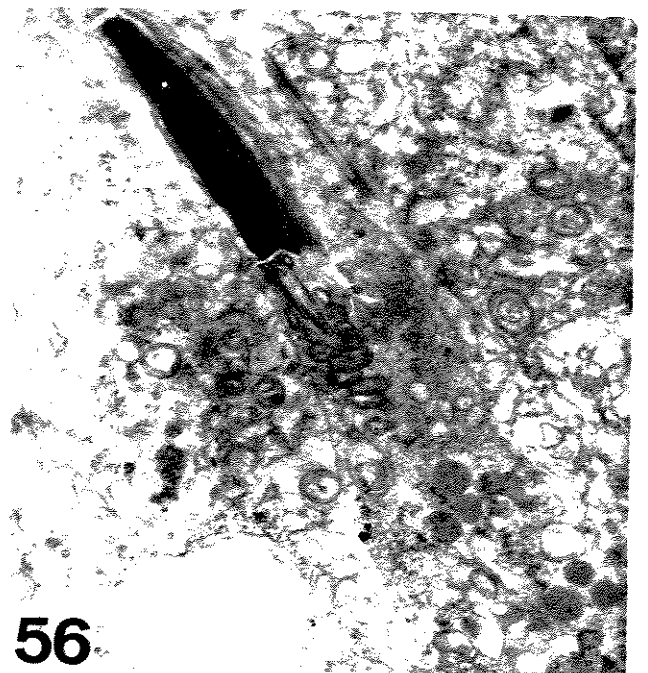
- Fig.51 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 800 mg/kg/dia (30 dias) de *Millicifolia*, onde são visíveis grandes espaços em volta da espermatogônia (E) e grandes corpos densos (possivelmente gotículas lipídicas) no citoplasma da célula de Sertoli (➤). 4950x.
- Fig.52 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com *Millicifolia* (800 mg/kg/dia, 30 dias), onde são visíveis espaços entre a célula de Sertoli (S) e as espermatogônias (E) e um corpo denso (possivelmente uma gotícula lipídica) no citoplasma da célula de Sertoli (➤). 4200x.
- Fig.53 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 800 mg/kg/dia de *Millicifolia*, que contém uma espermátide redonda com acrossomo dilatado e de formato irregular (➤) e uma espermátide alongada com núcleo bastante vacuolizado e com uma projeção posterior ao núcleo (➤). 6400x.
- Fig.54 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal "sham" do experimento com *Millicifolia* (800 mg/kg/dia, por 30 dias) que contém uma espermátide redonda com acrossomo normal (➤) e espermátides alongadas com núcleo bastante condensado. 5280x.



- Fig.55 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal tratado com 800 mg/kg/dia de *M.ilicifolia*, que mostra espermátides alongadas com alguma vacuolização no núcleo e uma projeção da região posterior da cabeça de uma delas, possivelmente oriunda do envoltório nuclear. Início da formação do flagelo é observado. 5530x.
- Fig.56 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle ("sham") do experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia), mostrando espermátide alongada com um ponto elétron-lúcido no núcleo e sem a projeção posterior neste. O início da formação do flagelo é observado. 8250x.
- Fig.57 - Corte ultrafino de um fragmento de testículo de animal controle do experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia), onde uma espermátide alongada (cabeça e peça intermediária do flagelo), em corte longitudinal, é observada. Núcleo bastante condensado, restringindo a vacuolização em um ponto elétron-lúcido. A projeção posterior do núcleo, vista nos animais tratados, é ausente. Há organização normal da peça intermediária do flagelo. 11230x.



56



57

4. Experimento 4: *A.millefolium*, 300 mg/kg/dia, por 30 dias

4.1 *A.millefolium*, 300 mg/kg/dia, por 30 dias

O tratamento de 300 mg/kg/dia do extrato alcoólico de *A.millefolium*, por 30 dias, não provocou diferenças significativas, entre os tratados, os controles e os "sham", ao que se refere ao peso corporal e ao peso dos testículos e das vesículas seminais, conforme pode ser observado na TAB. 4.

Durante o tratamento, não foram observadas alterações no comportamento dos animais e nenhum sinal de intoxicação.

Macroscopicamente, os órgãos internos dos animais tratados e "sham" pareciam normais e não se distinguiam daqueles dos animais controles.

Nos cortes histológicos, observou-se que a maioria dos túbulos seminíferos dos animais tratados e controles (incluindo os "sham") tinha luz vazia ou com espermatozóides, entretanto alguns túbulos seminíferos apresentavam descamação de células redondas (Fig.58). O epitélio germinativo, porém, não apresentou redução na sua espessura, como percebida nos animais tratados do outro experimento com *A.millefolium*. Entretanto alguns túbulos de animais tratados (Fig.59) e de um animal controle estavam vacuolizados e apresentavam hipoespermatogênese (Fig.60).

Vacuolização entre as espermatogônias e as células de Sertoli foi observada em alguns animais tratados (Fig.61) e em túbulos seminíferos da periferia do testículo de alguns "sham".

O interstício nos testículos dos animais tratados, principalmente naqueles com túbulos vacuolizados, era geralmente abundante e continha infiltrado (Fig.61). O interstício, nos animais controles e "sham" era bastante delgado (Fig.62).

Praticamente todos os túbulos seminíferos apresentavam espermatogênese normal, inclusive, aqueles dos animais tratados (Fig.63). Núcleos grandes e avermelhados, entre as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides redondas, foram encontrados em animais dos diferentes grupos do experimento (Fig.64 e 65). Na Fig.64, há o registro de uma grande vacuolização em torno de uma célula germinativa. Grupos de espermátides redondas eram vistos na luz de alguns túbulos seminíferos em corte longitudinal (Fig.65). Núcleos picnóticos na vizinhança de espermátides redondas e núcleos palidamente eosinófilos junto às espermátides alongadas eram comuns (Fig.66).

O epitélio germinativo dos testículos de animais tratados se diferenciou do epitélio germinativo dos animais controles pelo grande número de células em metáfase (Fig.67). Algumas células em anáfase também foram observadas.

Células alteradas, com núcleo irregular e fortemente corado, localizados na porção do epitélio germinativo próxima a luz do túbulo foram observadas num animal controle (Fig.68).

Nos túbulos vacuolizados, dos animais tratados foram encontrados vários tipos celulares, inclusive células multinucleadas e restos citoplasmáticos destas. Ao lado destes túbulos, havia regiões de interstício com aspecto fibroso (Fig. 69).

Num destes túbulos alterados, havia uma massa basófila no seu epitélio, que possivelmente era resultado de um aglomerado de espermatozóides. O citoplasma das células restantes dos túbulos parecia "hialino" (Fig.59).

Células redondas foram observadas na luz de túbulos do epidídimo de animais tratados (Fig.70) e controles.

Como os resultados obtidos na microscopia de luz não apontaram diferenças entre tratados e controles que merecessem uma investigação a nível ultra-estrutural, o material preparado para microscopia eletrônica não foi observado.

4.2 *A.millefolium*, 300 mg/kg/dia, por 30 dias e com período de recuperação (sem droga) de 30 dias

Os valores de peso corporal e peso dos testículos e das vesículas seminais, após um período de 30 dias sem droga, são demonstrados na TAB. 5. Eles não foram diferentes significativamente para animais tratados e controles.

A observação macroscópica dos órgãos, durante a dissecação, não revelou qualquer alteração.

Na análise das lâminas histológicas, foram encontrados, embora em menor número, núcleos grandes, avermelhados entre espermatogônias, espermatócitos e espermátides redondas; núcleos picnóticos e núcleos palidamente corados entre as espermátides alongadas. O interstício era normal. Nos animais controles ("sham"), os núcleos grandes e avermelhados e os núcleos picnóticos eram pouco frequentes. Células gigantes, com núcleo irregular e bem corado, semelhantes às encontradas nos controles desse experimento, sem período de recuperação (Fig.68), e célula gigante com grânulos basófilos, semelhante ao exibido na Fig.48, foram encontradas na luz de um túbulo seminífero de animal tratado.

Tabela 5- Efeito de 300 mg/kg/dia do extrato de *A.millefolium* sobre o peso corporal e o peso dos testículos e das vesículas seminais., após um período de recuperação de 30 dias.*

GRUPO TRATADO				GRUPO CONTROLE					
	PCI	PCF	PT	PV		PCI	PCF	PT	PV
	45	55	232,7	372,7		39	43	237,2	567,4
	43	45	177,8	424,4		39	47	253,2	578,7
	43	50	298,	536,		39	38	278,9	473,7
	43	48	241,7.	658,3		39	53	334,	564,1
	42	47	312,8	436,2					
	41	45	284,4	528,9					
	40	44	325,	511,4					
	40	50	252,	460,					
	40	49	387,8	369,4					
x	41,89	48,11	279,13	477,48		39	45,25	275,82	545,97
±SD	1,76	3,41	61,23	91,79		0	6,34	42,42	48,59

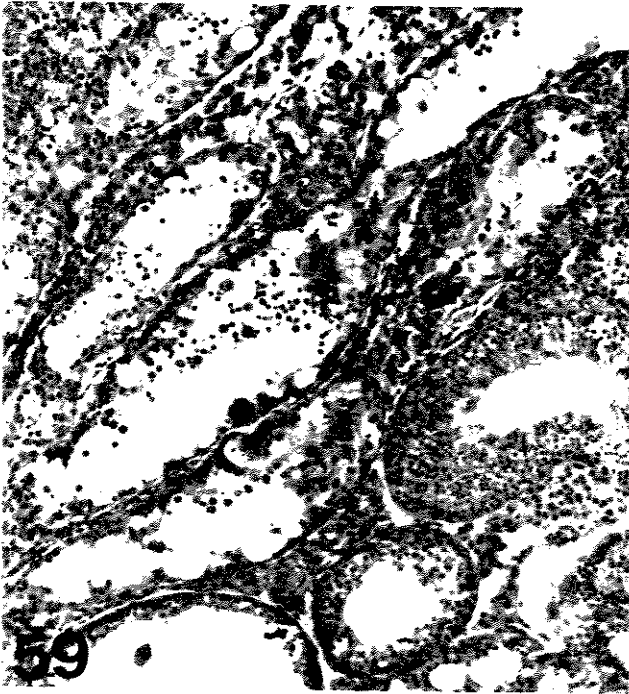
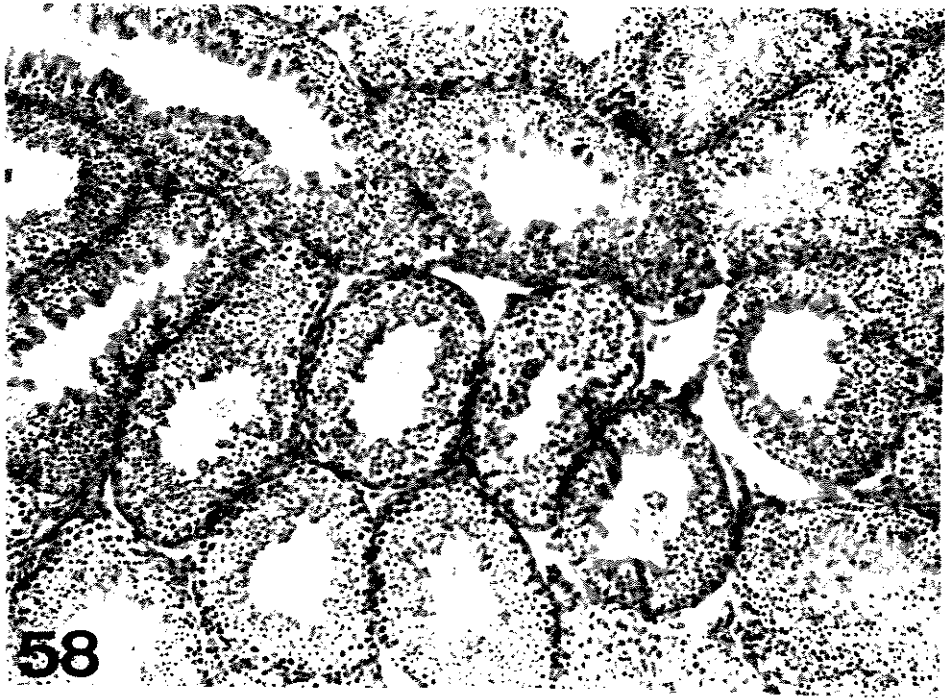
PCI=Peso Corporal Inicial, em g

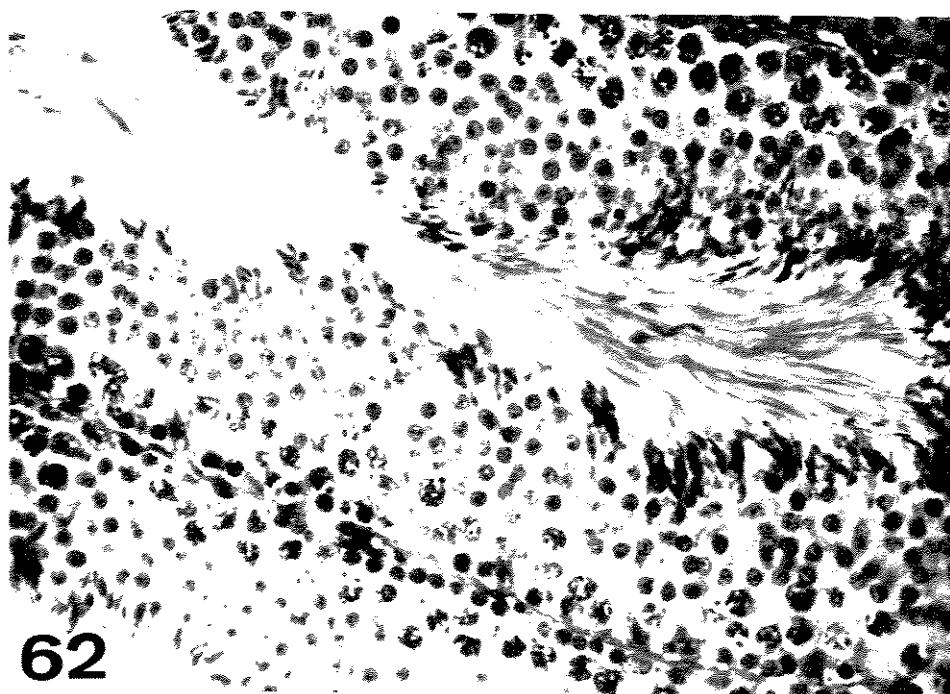
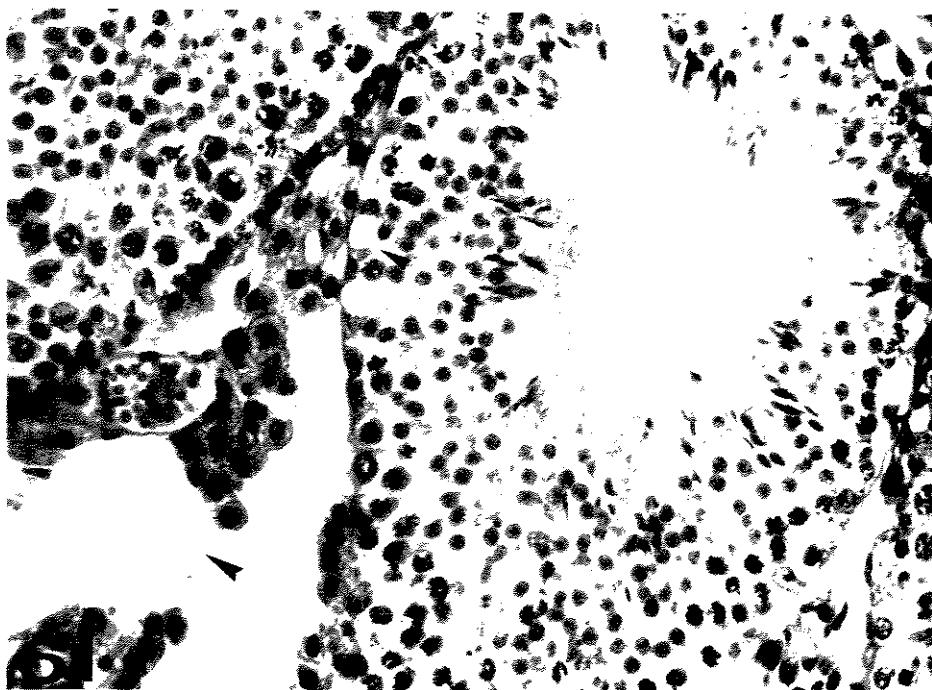
PCF=Peso Corporal Final, em g

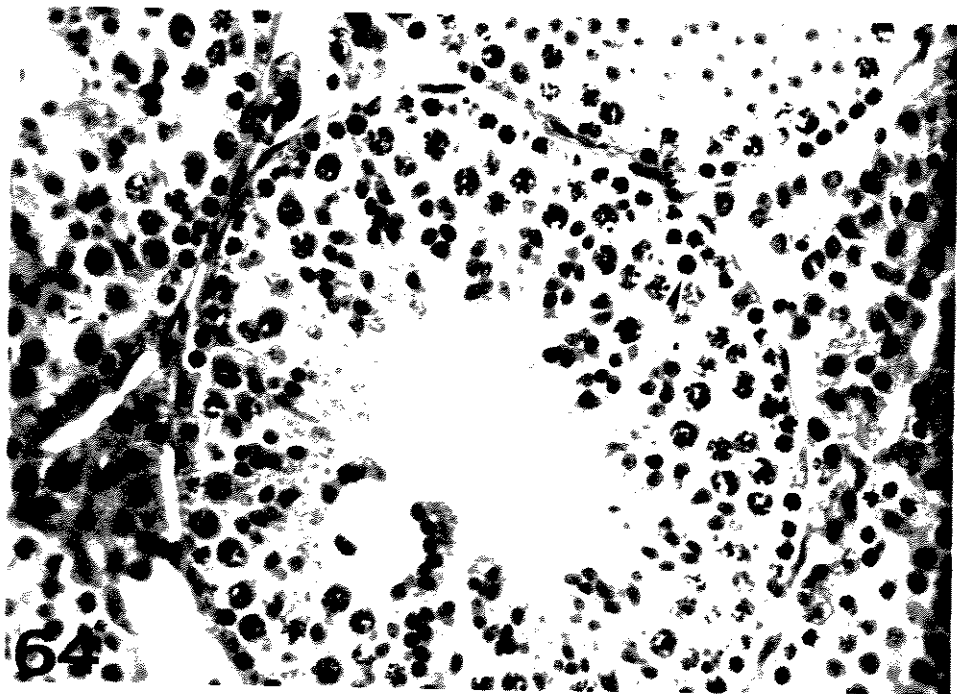
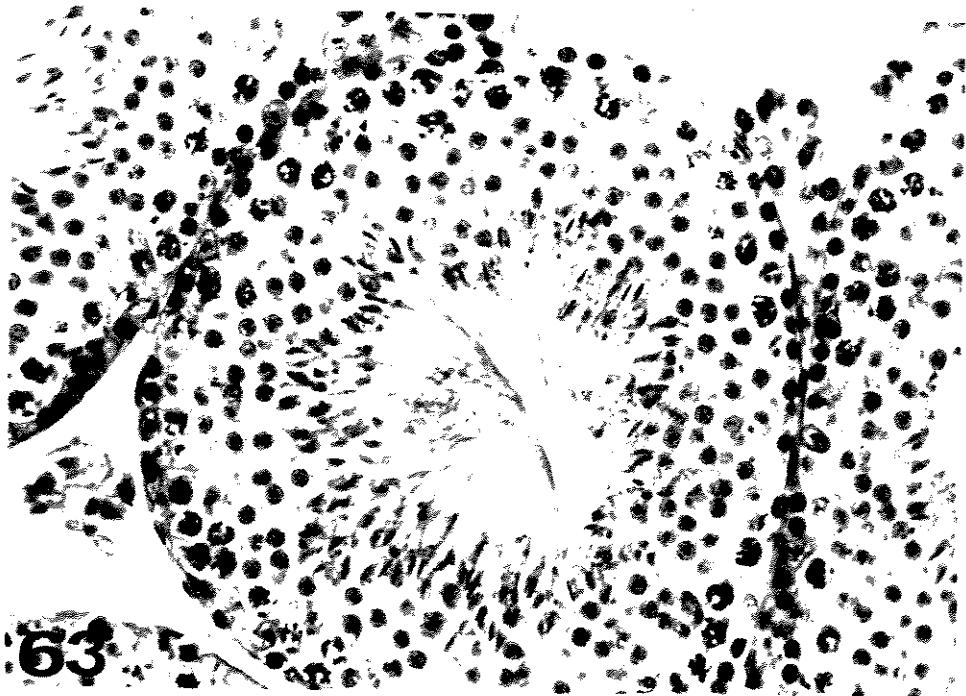
PT= Peso de um Testículo, em mg/100 g de peso corporal

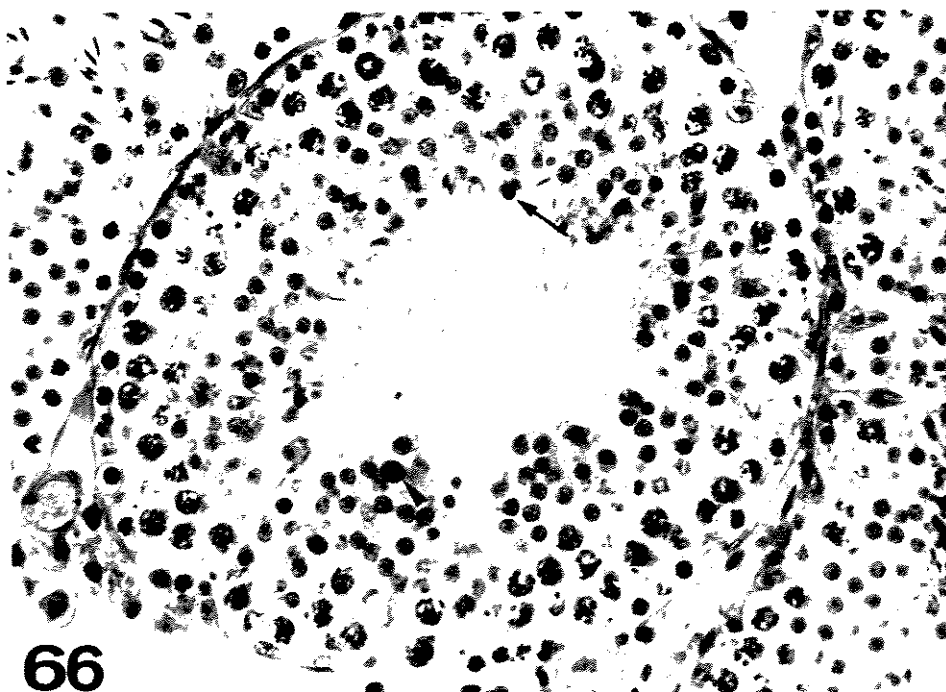
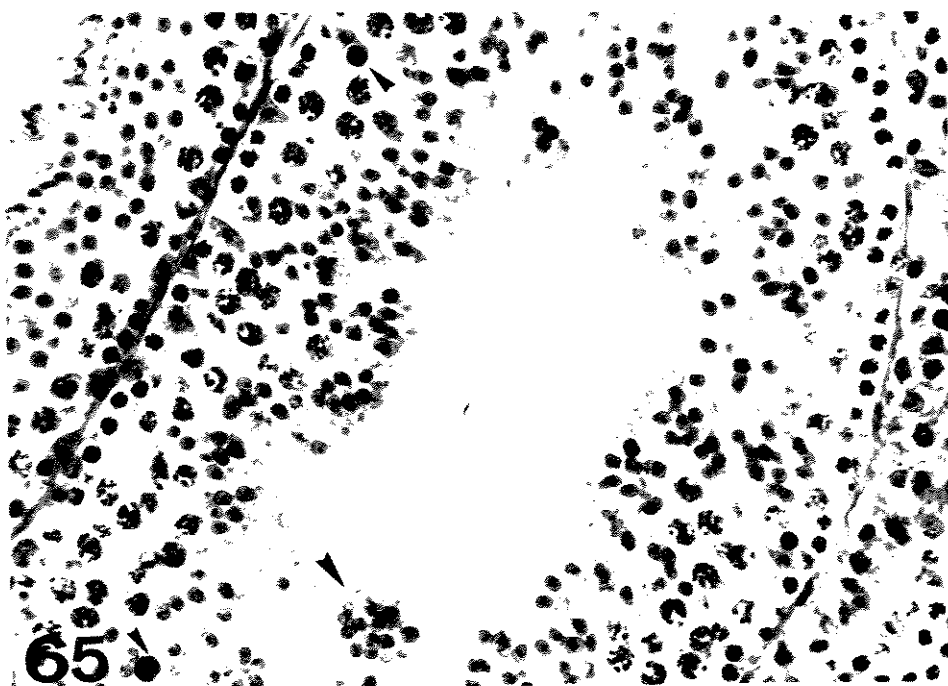
PV=Peso de uma Vesícula Seminal, em mg/100 de peso corporal

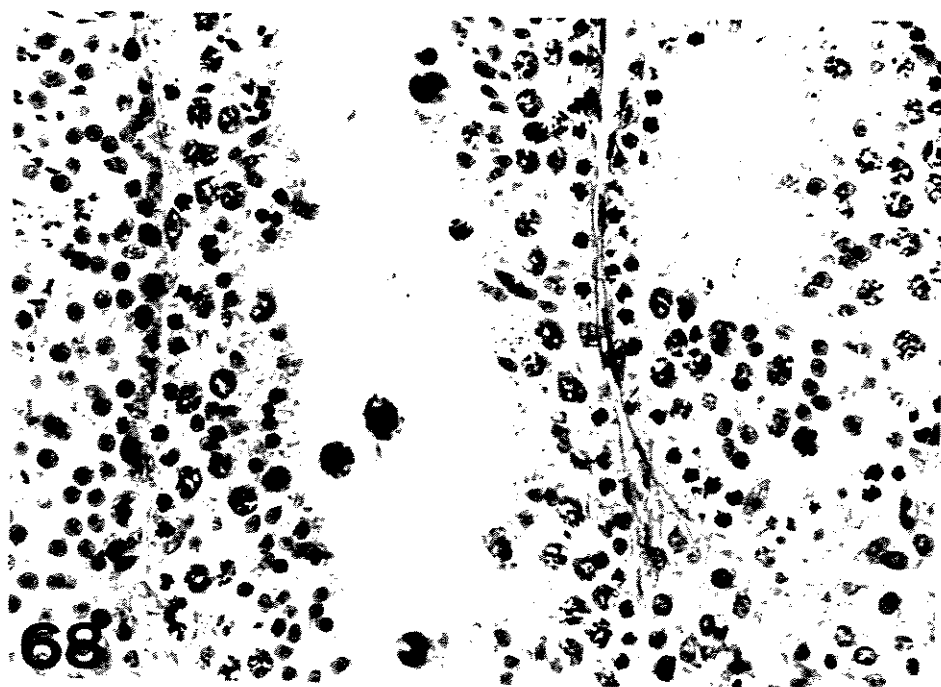
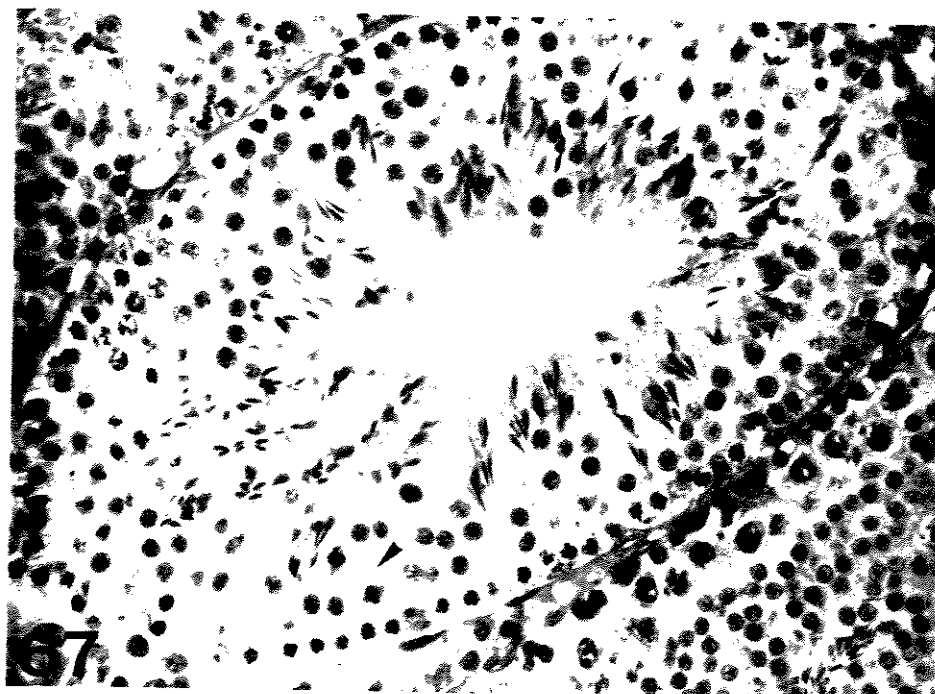
*=não há diferença significativa

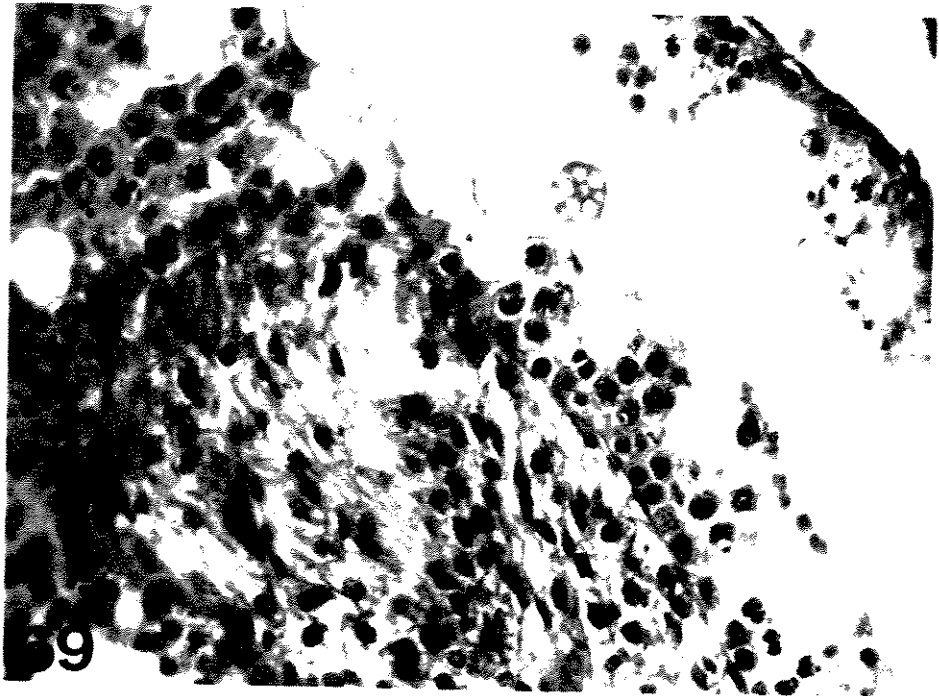










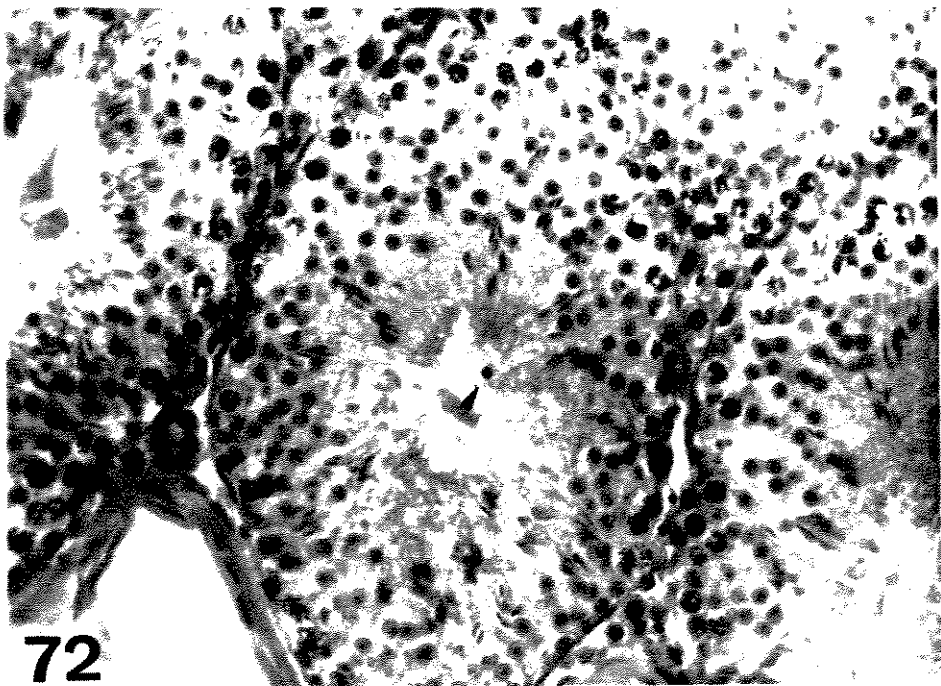
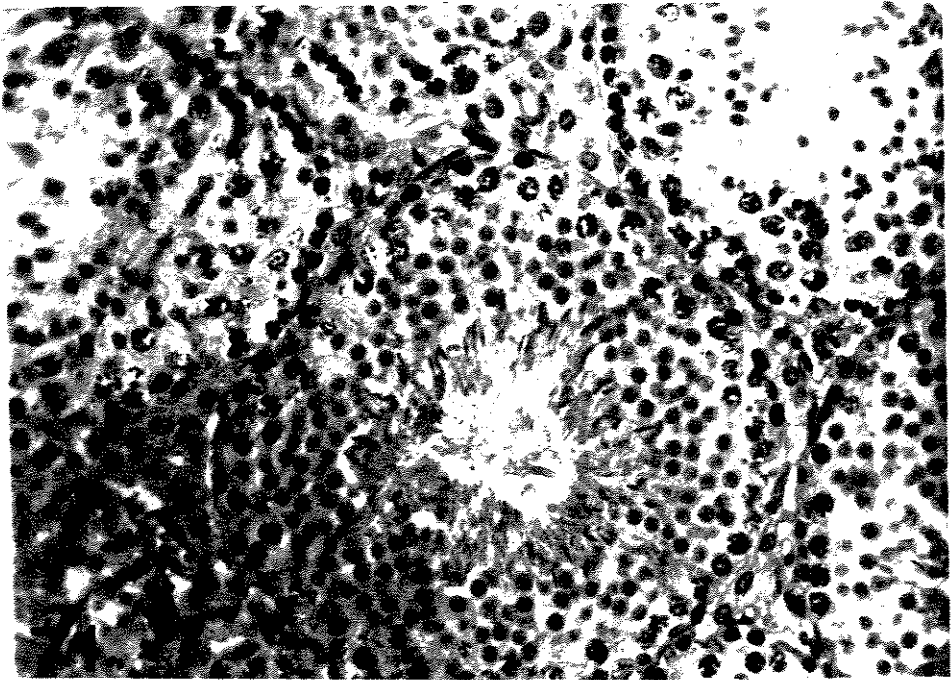


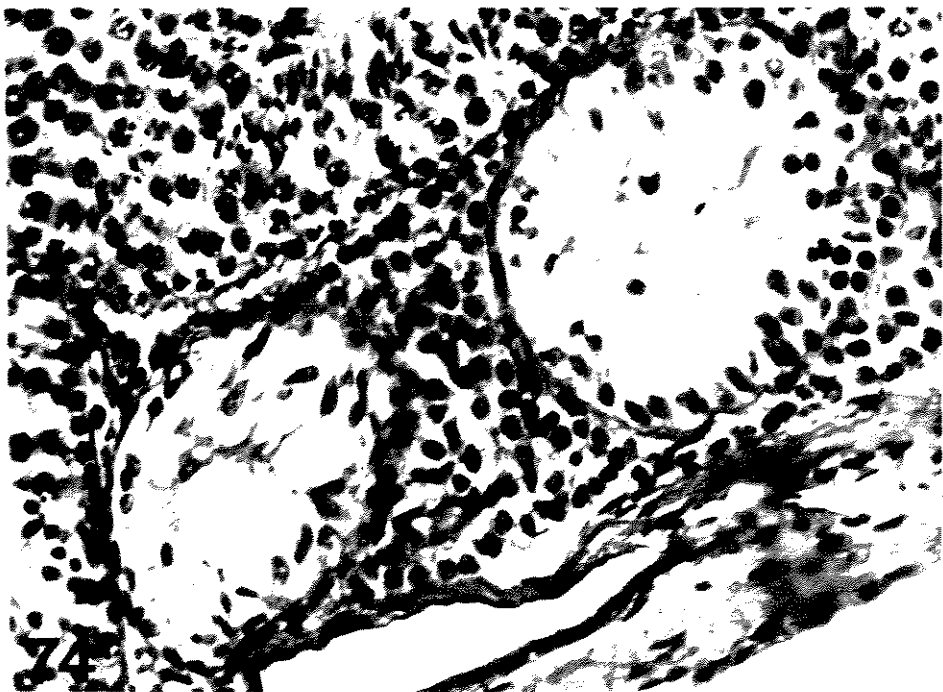
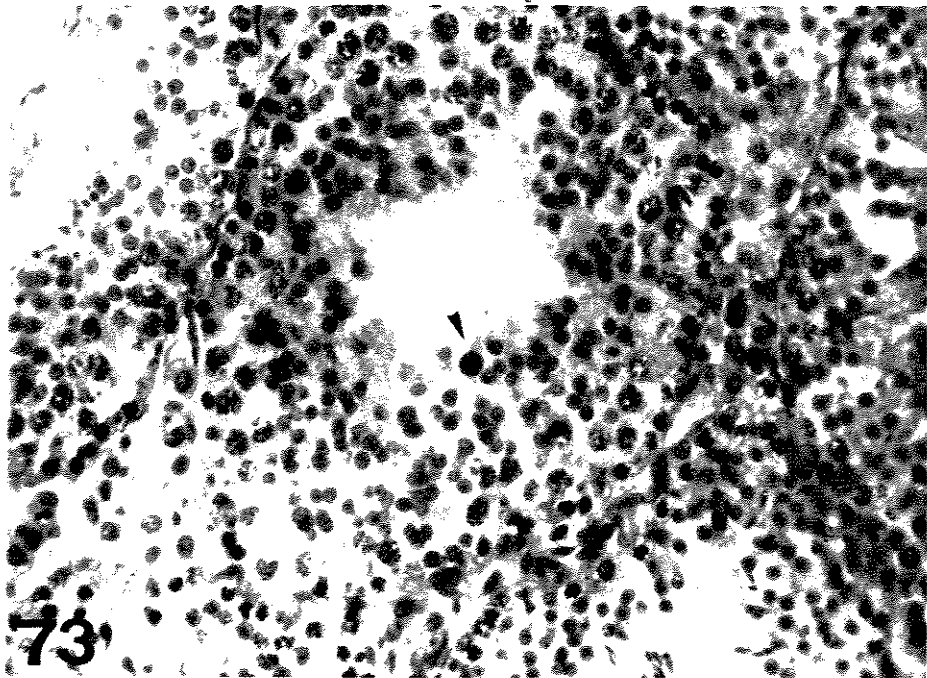
5. Estudo Prévio da Histologia dos Órgãos Reprodutores

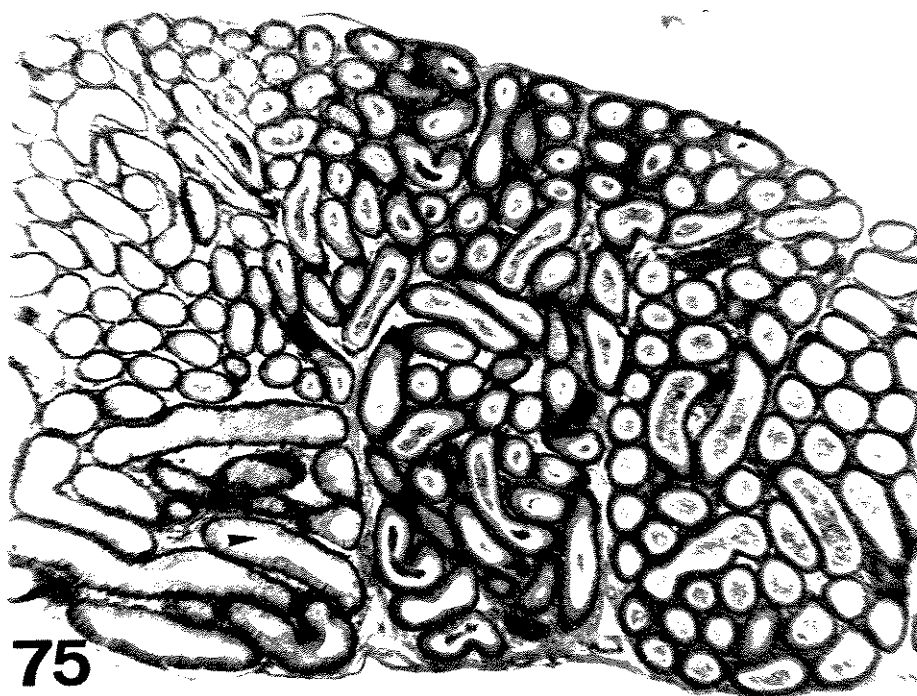
Nos animais estudados antes da realização dos experimentos, não foram encontradas células redondas na luz dos túbulos seminíferos (Fig. 71), mas foram observados núcleos picnóticos (Fig. 72), núcleos grandes, intensamente corados (Fig. 73) e núcleos irregulares, eosinófilos na camada de espermatídes redondas e alongadas e quase na luz dos túbulos (semelhante aos exibidos nas Fig. 7 e 46). Ainda menos comum eram os núcleos alterados entre espermatogônias e espermatócitos. Células em metáfase e em anáfase foram raramente visualizadas e eram restritas a um determinado estágio da espermatogênese.

Alguns túbulos seminíferos só com células de Sertoli (Fig. 74) ou também com algumas células germinativas das primeiras fases da espermatogênese foram vistos na periferia de um testículo.

Muitos túbulos da cabeça do epidídimo (aqueles da região mais proximal) não continham espermatozóides, mas os túbulos do corpo e da cauda do epidídimo estavam densamente preenchidos com espermatozóides (Fig. 75). Ocasionalmente eram vistas células redondas (semelhantes ao do epitélio do epidídimo), inclusive binucleadas (Fig. 76), e núcleos picnóticos na luz dos túbulos do epidídimo (Fig. 77).







DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade antiespermatogênica de uma substância são consideradas a redução no peso testicular, a histologia anormal do testículo e a infertilidade em 3 a 10 semanas depois do início do estudo (119). No presente trabalho, foram considerados o peso e a histologia do testículo, e acrescentaram-se observações a nível ultra-estrutural. Acasalamentos entre machos tratados e fêmeas normais, porém não foram realizados.

Alguns autores analisam a frequência dos estágios do ciclo do epitélio seminífero, buscando variações nessa frequência provocadas pelo tratamento, mas para tanto são necessários contar 200 túbulos por corte de testículo em, pelo menos, 12 animais se todos os estágios forem considerados ou em 10 animais se somente o estágio VII, que é o mais frequente, for considerado (81). Isto inviabilizaria as demais etapas do trabalho no fator limitante tempo, assim se optou por uma análise morfológica qualitativa desconsiderando a frequência dos diversos estágios.

A dose de 200 mg/kg/dia dos extratos de *M.ilicifolia* e *A.millefolium* dos primeiros experimentos foi assim estipulada tomando como base trabalhos que investigam o efeito de extratos vegetais sobre a espermatogênese, onde ela variava em torno de 100 e 250 mg/kg/dia (102,176,180). Para determinar o período de tempo que a droga deveria ser administrada também foi tomada como base a bibliografia consultada, onde ela variava de 15 a 60 dias (77,102,176,180).

Com a ausência de um efeito significativo no primeiro experimento com *M.ilicifolia*, decidiu-se administrar aos animais 800 mg/kg/dia do extrato, uma dose maior do que a dada pelo grupo do professor Dr.Carlini da Escola Paulista de Medicina, que já era 100 vezes maior àquela tomada pelo homem num chá (33).

Entretanto a dose do segundo experimento de *A.millefolium* foi mantida a valores próximos ao do primeiro (300 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia, respectivamente) devido à morte e ao comportamento anormal de alguns animais tratados. A dose foi levemente elevada, porque a administração oral tem efeito menos imediato que a intraperitoneal.

A opção pela via intraperitoneal, nos primeiros experimentos, deu-se pela sua maior eficácia, eliminando o risco de modificação dos princípios ativos no tubo digestivo do animal e, portanto, obtendo-se resultados mais rápidos. Entretanto a administração intraperitoneal, por 20 dias, deve ter provocado peritonite nos animais do experimento de *A.millefolium*, então se optou pela via oral nos próximos tratamentos, sendo essa mais usada para administração de extratos vegetais por períodos prolongados. Além disso, a via de administração deve refletir a mais desejável no ser humano (119).

Com a administração por via oral, o período de tratamento pôde se estender a 30 dias. Experimentos com a administração de extratos de planta, por via oral, geralmente duram 15, 30,

45 ou 60 dias (77,102,176,180). Para determinar este tempo de administração também se considerou o fato da espermatogênese do camundongo durar 34,5 dias (147).

Grupos com períodos de recuperação geralmente são realizados neste tipo de experimento. Em outros trabalhos variaram de 15 a 75 dias (53,77,102,125,180) após a última dose. Pelo fator limitante tempo, optou-se pelo prazo mais curto e suficiente para ocorrer o processo espermatogênico: 30 dias.

Os animais tratados com *A.millefolium*, por via intraperitoneal, e alguns animais controles tiveram um comportamento bastante diferente daqueles do experimento com *M.ilicifolia*, pela mesma via, e daqueles dos demais experimentos, que eram por via oral. Apresentaram diversos sintomas como: irritabilidade, pieloreção, contorções abdominais, edema abdominal e diarreia. Três animais que receberam *A.millefolium* morreram. O fato de alguns controles também terem apresentado esses sintomas leva a pensar que a administração, por este período (20 dias), pela via intraperitoneal, tenha produzido algum processo inflamatório ou infeccioso, ou que o detergente usado para emulsionar o extrato (Tween 20) e que também foi dado aos animais do grupo controle ("sham") seja responsável por estes efeitos. Entretanto este detergente foi usado por outros pesquisadores (198) com a mesma finalidade, sem nenhuma objeção.

A dissecação dos animais do experimento 2 mostrou que *A.millefolium* provocou vasodilatação e hemorragia, o que não ocorreu com os animais submetidos ao extrato de *M.ilicifolia*. Enquanto nestes só eram vistos grânulos da planta na cavidade abdominal e depositados sobre os órgãos reprodutores e tecido adiposo, nos animais tratados com *A.millefolium*, havia sangue na cavidade intraperitoneal, com deposição de coágulos sobre os órgãos, inclusive os reprodutores. Este sangue na cavidade intraperitoneal explica a hemorragia após a aplicação da droga.

Os órgãos reprodutores dos animais tratados por *M.ilicifolia* não diferiram macroscopicamente daqueles dos controles, entretanto os órgãos do aparelho reprodutor dos animais tratados por *A.millefolium*, por via intraperitoneal, eram envoltos por membranas, que foram retiradas como no caso dos testículos e dos epidídimos, na tentativa de encontrar o órgão em si. Entretanto isto representava, na verdade, uma alteração patológica dos órgãos. Estas membranas deveriam ser constituídas de fibrina e serem resultantes de um processo inflamatório, como uma peritonite, desencadeado pela presença de substâncias do extrato vegetal na cavidade intraperitoneal e nos tecidos dos órgãos como uma resposta a corpo estranho (MORAES, comunicação pessoal). Possivelmente ocorreu uma inflamação pseudomembranosa-fibrinosa, com a deposição de fibrina sob forma de películas ou véus, que eram facilmente retirados com a pinça (121).

Esta alteração fez com que os órgãos reprodutores aumentassem em volume e consequentemente em peso; por exemplo, uma vesícula seminal de um animal tratado era cerca de três vezes maior do que as dos demais, devido à sua deformação. Por outro lado, vesículas rudimentares também foram encontradas neste experimento, inclusive em um animal controle, o qual tinha uma vesícula normal e outra bem menor, não se compreendendo o porquê disto, pois até o presente nenhum dado sobre a frequência normal de um dos órgãos pareados ser rudimentar foi obtido.

A ausência de uma diferença significativa entre os animais tratados e controles ao que se refere ao peso corporal e ao peso das vesículas seminais indica que a produção de testosterona pelas células de Leydig não foi afetada e ao que se refere ao peso dos testículos sugere que a espermatogênese não foi prejudicada severamente, principalmente em relação a mudanças na espessura do epitélio germinativo. O tamanho dos testículos é intimamente correlacionado ao diâmetro dos túbulos seminíferos, e o diâmetro destes está relacionado à atividade espermatogênica, assim a supressão da espermatogênese reduz o diâmetro dos túbulos e, por conseguinte, do testículo (142). Uma ressalva sobre a relação entre peso dos testículos e espermatogênese deve ser feita: o peso dos testículos pode não se reduzir apesar de uma inibição da espermatogênese, se houver um aumento no tecido intersticial (196).

No segundo experimento com *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia, 30 dias, via oral), encontrou-se uma diferença significativa entre o peso corporal de animais tratados e controles, onde obteve-se uma grande perda de peso em dois animais tratados, que pode ter sido provocada pela introdução não adequada da cânula gástrica ou por ter sido administrado uma suspensão ao invés de uma emulsão.

Dificuldade em emulsionar o segundo extrato de *M.ilicifolia* foi encontrada. Possivelmente a grande quantidade do extrato necessária para preparar doses correspondentes a 800 mg/kg/dia exigia maior volume de detergente do que aquele usado. O receio de que o detergente, em tal quantidade, influenciasse os resultados fez com que se optasse por uma suspensão. Assim tem-se certeza de que os achados morfológicos obtidos com a segunda amostra de *M.ilicifolia* se devem ao extrato vegetal e não ao detergente.

Variação individual era presente nos valores de peso corporal e peso dos órgãos reprodutores, e isto se compreende por tratar-se de material biológico não isogênico. Na tabela do trabalho de SETH et al.(176) sobre o efeito de *Ocimum sanctum*, onde os valores do peso corporal e do peso dos órgãos reprodutores de cada camundongo, são exibidos, também se constata grande variação dentro do mesmo grupo.

Houve também variação no dano do testículo entre animais do mesmo grupo e variação no dano entre os túbulos seminíferos de um mesmo testículo, principalmente no experimento com *A.millefolium*, 300 mg/kg/dia, 30 dias, via oral, onde testículos de aspecto normal contrastavam com testículos com túbulos altamente vacuolizados e interstício abundante, com infiltrado e regiões de aspecto fibroso. BILLIS (20) também mencionou uma variação individual na severidade do prejuízo dentro de todos os grupos de coelhos submetidos à colapso ortostático e, dentro de cada testículo, uma diferença na severidade do dano nos cortes dos túbulos.

A respeito dos métodos de fixação, deve-se salientar o excelente resultado, a nível de microscopia de luz, obtido com a solução de Bouin, ao contrário do obtido com a solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5%) em tampão cacodilato 0,1M. Com este último fixador, o epitélio germinativo apresentou uma aparência "rachada" e havia espaços entre os túbulos e o interstício, possivelmente por causa da retração provocada pelo glutaraldeído, o que é evitado pelo ácido pícrico do Bouin (12). O material cromatínico se corava homogeneamente, mas sem a riqueza de detalhes fornecida pela fixação com Bouin, onde as

diversas etapas do ciclo celular, como paquíteno, metáfase e telófase, eram distinguidas. A coloração era acentuada nos cortes do material fixado pela solução de Karnovsky possivelmente pela maior retenção de proteínas através das ligações cruzadas entre estas e o glutaraldeído (174).

O protocolo usado para microscopia eletrônica permitiu imagens muito boas do material do experimento com *A.millefolium*, mas, no experimento com *M.ilicifolia*, os cortes tiveram que ser corados com acetato de uranila e recorados com citrato de chumbo sem se conseguir o mesmo contraste. A hipótese de problema na fixação deve ser considerada, apesar do rigor aos passos do protocolo e da presença de estruturas e organelas, como axonemas e mitocôndrias, bem preservadas.

Resultados bastante diferentes foram obtidos nos dois experimentos com *A.millefolium*. As variações no material e métodos desses experimentos, como fonte das amostras vegetais, tipo de solvente para extração e via de administração, devem ser levadas em consideração. A amostra do primeiro experimento era do CPQBA, portanto cultivada em Paulínia e a amostra do segundo experimento, da Albano Ferreira Martins Ltda, em São Paulo, não se tendo conhecimento de sua procedência. Elas foram cultivadas em regiões distintas e estavam sujeitas a condições climáticas e de solo diferentes. LAPA (111), sobre isso, mencionou que a capacidade sintética dos vegetais é muito influenciada pelo ecossistema, e plantas de uma mesma espécie crescendo em regiões de climas diferentes não apresentam necessariamente o mesmo metabolismo secundário; por esta razão, podem apresentar efeitos biológicos diferentes na dependência da concentração relativa desses princípios. Assim, a atividade medicinal de uma planta, em diferentes épocas e lugares, pode ter uma variação muito grande: desde atividade benéfica, quando predominam os princípios terapêuticos, até ação tóxica quando outros produtos predominam ou a síntese daqueles princípios é excessiva. Quanto à via de administração, sabe-se que muitas substâncias que têm atividade biológica, como os flavonóides, são degradadas no sistema digestivo (CARVALHO, em comunicação pessoal), o que pode ter ocorrido com a administração oral do extrato de *A.millefolium*. A administração intraperitoneal, por fazer com que as substâncias caiam diretamente na circulação sanguínea, aumenta o grau de toxicidade, como ocorreu nos nossos experimentos e como foi identificado em trabalhos com gossipol (87), onde os animais morreram quando este princípio era administrado por essa via. O solvente hidroalcoólico (usado no experimento com *A.millefolium* por via oral) pode ter extraído uma menor concentração de princípios ativos.

Epitélio germinativo com descamação foi o padrão histológico mais comumente achado, variando em frequência e severidade conforme o experimento. Os animais tratados com *A.millefolium*, por via intraperitoneal, foram os que mostraram a maior frequência e a maior severidade, chegando à redução do epitélio germinativo ou à indefinição do limite da luz do túbulo pelo preenchimento com células eosinófilas, que deveriam ser células germinativas das primeiras fases da espermatogênese em degeneração.

Há de se considerar outros fatores, além do tratamento, que também devem contribuir para a presença de células germinativas das primeiras fases da espermatogênese na luz dos túbulos seminíferos. O principal é o corte do testículo durante a dissecação, quando se separa uma parte a ser fixada para microscopia eletrônica. BERTACHINI, em comunicação pessoal, relatou a

visualização, em microscópio estereoscópico, da descamação dessas células germinativas, quando os túbulos eram cortados a fresco.

Tanto que, nos cortes histológicos de testículos de animais do experimento com *M.lilicifolia* (800 mg/kg/dia), os túbulos seminíferos com células germinativas redondas na luz eram mais frequentes próximos ao local onde foi seccionado o pedaço para microscopia eletrônica. Assim, no experimento seguinte (*A.millefolium*, 300 mg/kg/dia, 30 dias), um testículo foi destinado à microscopia óptica e o outro à microscopia eletrônica, para evitar tal artefato. Realmente o número de túbulos seminíferos com células germinativas redondas na sua luz foi bem menor, sendo restrito à periferia do testículo, e muitas vezes não ocorreu.

O estresse sofrido pelo animal durante o experimento pode também ter contribuído para tal descamação, já que em alguns controles ("sham") do primeiro experimento com *A.millefolium* foram encontrados túbulos com células germinativas redondas na sua luz.

Apesar dessas considerações, a comparação entre controles (mesmo "sham") e tratados revela que a esfoliação observada era maior em animais tratados, o que provavelmente se deve ao tratamento com 200 mg/kg/dia de *A.millefolium*, por intraperitoneal, por 20 dias.

As células esfoliadas no testículo vão juntamente com os espermatozoides para o epidídimo. Este fato permitiu distinguir a descamação pelo efeito da droga ou pelo estresse, daquela provocada pelo corte do testículo, já que este era cortado para uma parte ser destinada à microscopia eletrônica, somente depois de ser separado do epidídimo.

Esfoliação de células germinativas imaturas é um efeito característico dos agentes antiespermatogênicos. Foi obtida com 5-aminoindazol (126), gossipol (78,141) e *T.wilfordii* (164). Nos testículos e epidídimos de animais tratados com prostaglandinas, também foram observadas células germinativas imaturas, esfoliadas (1,2). Preenchimento da luz dos túbulos com restos celulares eosinófilos foi um dos efeitos da BCG, injetado intratesticularmente (186). Massas eosinófilas foram vistas nos túbulos seminíferos de camundongos tratados com 5-tio-D-glicose (119). Redução nas camadas do epitélio germinativo também foi provocada por esta substância (125).

Como mencionado na introdução, a perda de células germinativas e de corpos residuais para a luz dos túbulos seminíferos pode ser resultante de dano às células de Sertoli (62). Entretanto, ao que se refere aos corpos residuais, deve-se ressaltar que, em determinados estágios, da espermatogênese, sua presença, na luz dos túbulos, é normal (129,172).

Núcleo picnótico, que é um núcleo reduzido de volume e hipercoreado (121), foi o tipo nuclear alterado mais frequentemente encontrado no primeiro experimento (*M.lilicifolia*, 200 mg/kg/dia), estando presente inclusive nos controles ("sham") e, com variação na quantidade, esteve presente na maioria dos testículos. Este fenótipo nuclear foi encontrado em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de *Triatoma infestans* Klug submetidas a choques térmicos. Como foi observado 30 dias após o choque térmico, concluiu-se que era um efeito degenerativo a longo prazo (47).

Os efeitos de agentes estressantes (como, por exemplo, jejum, tratamento com metais pesados, radiação e choque térmico) ao nível nuclear geralmente envolvem mudanças no estado de empacotamento da cromatina e promovem vários graus de degeneração na população nuclear (109,130). Isto deve explicar a presença de núcleos de espermátides alongadas, não condensados (descritos como núcleos irregulares, palidamente corados entre as espermátides alongadas) e núcleos com cromatina bem compactada (núcleos avermelhados ou intensamente basófilos) vistos entre espermatogônias, espermatócitos e espermátides redondas nos testículos dos camundongos. Necrose em espermatogônias também foi obtida com sulfato de vinblastina (28). Mudanças picnóticas e cromatolíticas foram vistas nos espermatócitos de animais de um experimento com "methallibure" (51). Espermatócitos primários em degeneração e espermátides na fase capuz necróticas foram observadas em ratos tratados com acetato de clomifeno, um inibidor da liberação de gonadotrofinas (63).

As células alteradas entre espermatócitos e espermátides observadas em muitos testículos devem corresponder ao que BILLIS (20) denominou espermatócitos primários hipertróficos e espermátides redondas hipertróficas, observadas nos testículos de coelhos submetidos a colapso ortostático e raramente nos de controles.

A presença de células alteradas no epitélio germinativo de animais controles é explicada pelo fato de haver necrose de células germinativas, principalmente de espermatogônias A e espermatócitos, mas também, embora em menor quantidade, de espermátides nos estágios iniciais da espermiogênese, no epitélio germinativo de camundongos normais. Células acidófilas, grandes também foram observadas durante a divisão meiótica, no epitélio germinativo de camundongo normal (146).

O fato das células germinativas constituírem um sistema onde ocorre constante e rápida divisão celular permite que a presença de substâncias que afetem o ciclo celular seja rapidamente constatada.

O maior número de células em metáfase, encontrado nos túbulos seminíferos de animais tratados com 300 mg/kg/dia (30 dias) de *A.millefolium*, pode ser resultado de vários mecanismos. Um destes seria o bloqueio na formação do fuso mitótico como ocorre com o uso da colchicina (127). Acúmulo de metáfases nas espermatogônias também foi observado com a administração de sulfato de vinblastina (28). Entretanto não foi encontrado, na literatura, menção da presença de substâncias citotóxicas na *A.millefolium*. Outra hipótese seria a de que essa planta provoca uma intensa proliferação celular, o que é apoiado pelo fato de ser usada como cicatrizante (35,56).

Apesar dos triterpenos citotóxicos (os maitansinóides) presentes em *Millicifolia*, não se observou um aumento no número de células em metáfase nos túbulos seminíferos dos animais tratados com esta planta. Possivelmente eles estavam em concentração muito baixa, no extrato bruto, para produzirem qualquer efeito. Seria interessante realizar experimentos com extratos purificados, que aumentassem a concentração dessas substâncias, para verificar se podem interromper a espermatogênese.

Fibrose peritubular não foi encontrada, mas túbulos só com células de Sertoli ou ainda com algumas células germinativas das primeiras fases da espermatogênese, como espermatogônias e espermatócitos primários, semelhantes às imagens de aplasia germinativa e de parada de maturação mostradas por BILLIS (21) foram observados. Entretanto estes túbulos também estavam presentes em controles, na periferia de seus testículos, levando à hipótese de que em determinadas regiões dos túbulos seminíferos seja normal a presença de somente células de Sertoli e espermatogônias. Nada a respeito foi encontrado na literatura.

Em um rato tratado por acetato de clomifeno, os túbulos seminíferos eram ocupados só por células de Sertoli (63). E, no experimento com *T.wilfordii*, alguns túbulos só com uma camada de espermatogônias e células de Sertoli, adjacentes a túbulos não danificados, eram encontrados em testículos de ratos (164). BILLIS (20) também encontrou túbulos seminíferos só com células de Sertoli e espermatogônias em coelhos submetidos a colapso ortostático.

Outro ponto não abordado na literatura que dificulta a interpretação dos achados histológicos é a ocorrência de túbulos vacuolizados. Em todos os experimentos, alguns túbulos vacuolizados foram encontrados, inclusive em controles. A vacuolização, no entanto, foi mais severa em alguns animais tratados com 300 mg/kg/dia de *A.millefolium*, por 30 dias, onde praticamente a metade do testículo era atingida. Este tipo de alteração também foi encontrado com sulfato de vinblastina (28), o que sugere que a vacuolização se deva à morte celular, como consequência da presença de substâncias citotóxicas.

O tecido intersticial nos testículos de animais tratados geralmente não diferiu dos controles. Muitas vezes as células de Leydig eram bastante desenvolvidas, mas não foi possível determinar se é um caso de hiperplasia das células de Leydig. Vários agentes antiespermatogênicos diferentes parecem promover hiperplasia das células de Leydig, talvez por interferir com o balanço das gonadotrofinas da pituitária pelo seu efeito comum na espermatogênese (144). Em alguns casos, foi encontrada, no tecido intersticial de alguns testículos de animais tratados com *M.lilifolia* e com *A.millefolium*, uma substância granular eosinófila abundante, que foi interpretada como infiltrado linfocitário. Hiperplasia das células de Leydig e infiltração de leucócitos foram obtidas em trabalhos que utilizaram BCG, por via intratesticular (186,191).

Como pôde ser observado em nossos experimentos, o aumento do interstício e a presença de infiltrado geralmente estavam relacionados com a vacuolização dos túbulos seminíferos. Em experimento com propionato de testosterona, que provocou vacuolização dos túbulos seminíferos pela descamação de células germinativas, edema do interstício também foi observado (3).

Regiões do interstício com aspecto fibroso foram observadas ao lado de túbulos severamente vacuolizados de um animal tratado com 300 mg/kg/dia de *A.millefolium*. O interstício de animais que receberam BCG, intratesticularmente, também era fibrinótico (191). Este fato sugere que a alteração do interstício foi devida ao tratamento.

Vacuolização entre espermatogônias e células de Sertoli era observada em alguns túbulos seminíferos, principalmente naqueles que se situam na periferia do testículo. Esta observação

também foi feita em testículos de animais tratados com *M.conzattii* (95).

Ao microscópio eletrônico, este achado foi reforçado pela visualização de grandes espaços entre as espermatogônias e as células de Sertoli nos animais tratados com 200 mg/kg/dia de *A.millefolium* e com 800 mg/kg/dia de *M.ilicifolia*.

Existe grande discussão sobre a localização de vacúolos no epitélio germinativo, isto é, se os vacúolos estão dentro das células de Sertoli ou se são deixadas pela degeneração de espermatogônias (62,101). Entretanto aqui tem-se uma terceira localização. A vacuolização entre as espermatogônias e as células de Sertoli vista ao microscópio óptico consiste em um maior espaçamento entre as espermatogônias e as células de Sertoli, como pôde-se constatar ao microscópio eletrônico.

Corpos densos foram geralmente vistos nas células de Sertoli, ao microscópio eletrônico, e possivelmente são gotículas lipídicas. Nas células de Sertoli dos animais tratados por *M.ilicifolia* (800 mg/kg/dia, 30 dias), no entanto, eles eram bem maiores do que nos demais, sugerindo algum problema no metabolismo lipídico destas células ou acúmulo de vesículas com material descartado pelas espermátides, que não conseguiu ser reabsorvido pelas células de Sertoli.

Corpos multivesiculares e figuras de mielina encontradas nas células de Sertoli devem ser resultado da sua capacidade absorptiva. Infere-se isto devido à presença destas estruturas nas células principais do epidídimo, onde refletem a função de absorção destas células (4). Células de Sertoli de animais tratados com acetato de ciproterona, acetato de clomifeno, enantato de testosterona, 5-tio-glicose e *T.wilfordii* também continham muitas gotas lipídicas de grande tamanho e estruturas como lisossomos com restos celulares e elementos membranosos (63, 64,65, 125,164). A capacidade das células de Sertoli fagocitarem células germinativas degeneradas e citoplasma descartado ao longo da espermatogênese têm sido demonstrada por vários pesquisadores (125).

As mitocôndrias de cristas curtas, intensamente "coradas", presentes nas células germinativas são normais e típicas nessas células. Foram mencionadas na literatura (26) como "mitocôndrias de parede grossa" ("thick walled mitochondria").

Ao microscópio eletrônico, espermátides redondas interligadas e multinucleadas foram reconhecidas. BILLIS (20) identificou espermátócitos e espermátides binucleadas, ao microscópio óptico, em testículos e epidídimos de coelhos submetidos a colapso ortostático. Entretanto é normal, na espermatogênese, a presença de células germinativas multinucleadas, como foi mencionado na introdução (25,26).

Em um animal controle do experimento com *A.millefolium*, foram encontrados alguns flagelos com o número de duplas de microtúbulos do axonema incompleto, mas, em homens de fertilidade normal, ausência de algumas duplas periféricas de microtúbulos, entre outros defeitos, também foi observada no flagelo de alguns espermatozóides (70) e, portanto, uma falta ocasional pode ser considerada dentro da normalidade.

A ausência das membranas da vesícula acrossômica e de material elétron-denso junto ao núcleo da espermátide de um animal tratado por *A.millefolium*, mostrada na Fig.31, pode ser devida à incompleta formação do acrossomo no momento da fixação, ao invés de uma alteração da formação do acrossomo.

Entretanto, nas espermátides redondas de animais tratados por *M.ilicifolia*, foram encontrados acrossomos deformados e dilatados. Os núcleos das espermátides dos animais tratados também diferiram daqueles dos controles pela maior vacuolização e pela presença de uma projeção posterior, possivelmente oriunda do envoltório nuclear, que lembra o bulbo nuclear de espermátides de insetos, uma protuberância na região posterior do núcleo, com material de baixa densidade eletrônica, que está relacionada com a eliminação do excesso de nucleoplasma e de envoltório nuclear (DOLDER, comunicação pessoal; 166).

Espermátides com vesícula acrossômica deformada e núcleo com vacúolos pequenos foram observadas também no experimento com *T.wilfordii*, onde se constatou um efeito antiespermatogênico (165), podendo-se então relacionar esta deformação com efeito do tratamento.

A ausência de espermatozóides nos túbulos da cabeça do epidídimo foi mencionada por vários autores (63,65) como efeito da droga administrada. Entretanto isto é um fato normal e bem conhecido para os pesquisadores da área: espermatozóides contidos na luz são escassos no segmento I (segmento I,II e III constituem a cabeça), mas eles aumentam em número nas regiões distais do ducto, sendo mais numerosos na cauda do epidídimo, onde eles formam massas de células que preenchem totalmente os ductos (4,8). A razão disto é que o armazenamento dos espermatozóides se dá na região distal do epidídimo. A região proximal serve para a maturação dos espermatozóides na sua passagem (11). Este fato explica porque tantos túbulos vazios são encontrados na cabeça de epidídimos tanto de tratados como controles.

A presença de células sanguíneas de defesa, como neutrófilos e eosinófilos, em epidídimos de alguns animais do segundo experimento reforça a idéia de que estes animais estavam com alguma inflamação. Entretanto, aumento na contagem de leucócitos foi resultado do tratamento, num experimento com alfa-cloridrina (24).

As células alongadas com núcleo numa extremidade observadas no epidídimo de animais do quarto experimento, inclusive em controles, e de camundongos não tratados lembram as células colunares do epitélio do epidídimo. Há de se considerar a hipótese de uma perda de células em degeneração do epitélio do epidídimo para a sua luz.

Os testículos dos animais tratados com *A.millefolium*, por via intraperitoneal, mostraram alterações morfológicas severas, que consistiam de necrose das células germinativas, descamação de células germinativas imaturas e redução no epitélio germinativo. Entretanto nem todos os túbulos seminíferos foram prejudicados. A espermatogênese ocorreu em muitas regiões, permitindo que os espermatozóides fossem encontrados nos túbulos do epidídimo. Em alguns animais controles, também foram encontrados túbulos seminíferos com células germinativas imaturas no seu interior, mas o epitélio germinativo manteve sua espessura típica.

Nos demais experimentos, tanto com *M.ilicifolia*, como com *A.millefolium*, por via oral, as diferenças na espermatogênese entre tratados e controles eram mais sutis, consistindo principalmente de células germinativas alteradas ao nível da compactação da cromatina. O efeito mais severo foi encontrado em alguns animais tratados com *A.millefolium* que apresentavam muitos túbulos seminíferos vacuolizados e com células gigantes multinucleadas na sua luz. Estas células também foram obtidas com a administração de propionato de testosterona (3,125). Elas eram provavelmente resultantes de irregularidades na citocinese e na cariocinese (125).

Apesar desses túbulos alterados, a espermatogênese se deu normalmente, levando à presença de muitos espermatozóides nos epidídimos. Uma contagem de espermatozóides em esfregaço seminal se faz necessária para concluir se houve alguma queda na produção de espermatozóides, mas a morfologia pouco alterada leva à conclusão que extratos destes vegetais têm pouco efeito sobre a espermatogênese e portanto sobre a fertilidade.

As lacunas que ainda existem no conhecimento a respeito da Reprodução Masculina dificultam a compreensão de alguns resultados. Muito apropriada é a observação do Grupo Assessor em Reprodução Humana do Conselho Europeu de Pesquisa Médica ("European Medical Research Council Advisory Subgroup on Human Reproduction"): "São necessárias mais pesquisas básicas sobre a fisiologia e a patologia do sistema reprodutor masculino antes de que novos métodos contraceptivos masculinos possam ser desenvolvidos" (160).

CONCLUSÕES

Pequenas alterações nas células dos testículos dos animais tratados com *M. millefolium* foram observadas a nível ultra-estrutural, entretanto essas não foram suficientes para provocar uma desorganização do epitélio germinativo que fosse percebida na microscopia de luz. Pode-se concluir que o seu uso popular como planta medicinal não deve provocar, como efeito colateral, distúrbios na espermatogênese.

A. millefolium apresentou algumas características de agente antiespermatogênico, como a esfoliação de células germinativas imaturas. É sugerido uma possível presença de substâncias citotóxicas no extrato, baseado na observação de um maior número de espermatogônias e espermátócitos em metáfase e de túbulos seminíferos com somente células germinativas das primeiras fases da espermatogênese no epitélio e com células gigantes multinucleadas na sua luz. A maior frequência de metáfases também pode indicar um componente de efeito estimulador da proliferação celular, o que é apoiado pelo fato desta planta ser usada como cicatrizante.

RESUMO

O efeito de *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reiss ("espinheira-santa") e *Achillea millefolium* L. ("milfolhas") sobre a espermatogênese de camundongos albinos "Swiss" foi estudado a nível morfológico (microscopia de luz e eletrônica). Essas espécies são plantas medicinais, de uso popular e são utilizadas como reguladoras da fertilidade.

Extratos alcoólicos de folhas de *M.ilicifolia* foram administrados em doses diárias de 200 mg/kg, por 20 dias, por via intraperitoneal e em doses de 800 mg/kg/dia, por 30 dias, por via oral. Extrato alcoólico de flores de *A.millefolium* foi administrado em doses diárias de 200 mg/kg, por 20 dias, por via intraperitoneal, e extrato hidroalcoólico, em doses de 300 mg/kg/dia, por 30 dias, por via oral.

As alterações observadas nos testículos dos animais tratados com *M.ilicifolia* e com *A.millefolium* foram: esfoliação de células germinativas imaturas, necrose de células germinativas (constatada através de núcleos picnóticos e hipertróficos) e vacuolização de túbulos seminíferos. Essas alterações variavam em intensidade nos diferentes experimentos. Em alguns controles, também foram encontrados núcleos picnóticos e alguns túbulos vacuolizados ou com somente células de Sertoli.

A nível estrutural, os testículos de animais tratados com 200 mg/kg/dia e 800 mg/kg/dia de *M.ilicifolia* não diferiram dos controles. Entretanto, a nível ultra-estrutural foram observados gotículas lipídicas de grande tamanho nas células de Sertoli e acrossomos deformados e dilatados nas espermátides jovens dos animais tratados com a maior dose. A maioria dos túbulos seminíferos dos animais tratados por *M.ilicifolia* apresentava espermatogênese normal, resultando na produção de espermatozóides, indicando que o seu extrato alcoólico não continha substâncias, qualitativa ou quantitativamente, capazes de interromper o processo espermatogênico.

Os túbulos seminíferos dos animais tratados com 200 mg/kg/dia de *A.millefolium*, por via intraperitoneal, por 20 dias, foram os mais prejudicados. Muitos apresentavam descamação de células germinativas imaturas, que preenchiam a sua luz, e tinham epitélio germinativo reduzido. Naqueles de animais tratados com 300 mg/kg/dia do extrato (por via oral), foram encontradas muitas células em metáfase, que podem ser decorrentes de um bloqueio no ciclo celular ou de um estímulo à proliferação celular, provocados por substâncias nela presentes. O fato dos testículos dos animais tratados por via intraperitoneal terem sido mais afetados sugere que as substâncias responsáveis por essas ações ou estão em baixa concentração no extrato hidroalcoólico ou são degradadas durante a absorção oral.

ABSTRACT

The effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss and *Achillea millefolium* (yarrow) was tested on the spermatogenesis of Swiss albino mice, evaluating morphological characteristics with the light and electron microscopes. These species are medicinal plants which have been used in popular medicine for various cures and for fertility regulator.

A daily dose of 200 mg/kg of the alcoholic extract of *M.ilicifolia* leaves was administered intraperitoneally, for 20 days, and a daily dose of 800 mg/kg, orally, for 30 days. The alcoholic extract of *A.millefolium* flowers was daily administered at doses of 200mg/kg, intraperitoneally, for 20 days and 300mg/kg of the hydroalcoholic extract, orally, for 30 days.

The alterations observed in testes treated with *M.ilicifolia* and *A.millefolium* included immature germ cells, germ cell necrosis (recognised as picnotic and hypertrophic nuclei) and vacuolized seminiferous tubules. These variations were not the same in the different experiments. In some controls, were also found picnotic nuclei and some vacuolized tubules.

Structural analysis of animals treated with 200 mg/kg/day or 800 mg/kg/day of *M.ilicifolia* were not noticeably different from the controles. Ultrastructurally, greatly enlarged lipid droplets were found in Sertoli cells and dilated, deformed acrosomes occurred in early spermatids of animal treated with the higher dose. Normal spermatogenesis was found in most of the seminiferous tubules of mice treated with *M.ilicifolia*. Sperm production indicated that its alcoholic extract do not contain adequate or sufficient substances to arrest the spermatogenic process.

Seminiferous tubules of animals treated intraperitoneally with *A.millefolium* at a dose of 200 mg/kg/day for 20 days were the most severely affected. Many tubules were exfoliated with immature germ cells occupying the lumen and reduction of the germ cell layer. Animals treated with 300 mg/kg/day of *A.millefolium* had tubules with an increased number of metaphases which may be a consequence of cell cycle blockage or be due to a proliferation stimulus, caused by the plant extract. The fact of the testes of intraperitoneally treated animals have been more affected suggest that the active principle have been low concentration in the hydroalcoholic extract or it was degraded during the oral absorption.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABBATIELLO, E.R. et al. The effect of prostaglandins and prostaglandin inhibitors on spermatogenesis. *Int.J.Fertil.*, v.20, n.3, p.177-182, 1975.
- 2 _____. The effect of prostaglandins and prostaglandins F1 α and F2 α on spermatogenesis. *Int.J.Fertil.*, v.21, n.2, p.82-88, 1976.
- 3 ABDI, S.H.M; HASAN,W. Effect of testosterone on the histological structure of the testis of adult albino rats. *Indian J.Med.Res.*, v.61, n.8, p.1207-1211, 1973.
- 4 ABE, K. et al. Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. *Arch.histol.jap.*, v.46, n.1, p.51-68, 1983.
- 5 AHMED, M.S. et al. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytaninoids in *Maytenus ilicifolia*. *J.Chromatogr.*, v.213, p.340-344, 1981.
- 6 ARENAS, P.; MORENO AZORERO, R. Plants of common use in paraguayan folk medicine of regulating fertility. *Econ. Bot.*, v.31, n.3, p.298-301, 1977.
- 7 _____. Plants used as means of abortion, contraception, sterilization and fecundation by paraguayan indigenous people *Econ. Bot.*, v.31, n.3, p.302-306, 1977.
- 8 BAILLIE, A.H. et al. The Testis and Epididymis. In: _____. *Developments in steroid Histochemistry*. London: Academic Press, 1966. p.60.
- 9 BARNES, C.S. et al. An examination of some reputed antifertility plants. *Lloydia*, v.38, n.2, p.135-140, 1975.
- 10 BASU, S. L. et al. Reversible sterility due to diminished glucose metabolism in male mice treated with 5-thio-D-glucose. *Indian J. Exp. Biol.*, v.17, n.7. p.632-636, 1979.
- 11 BEDFORD, J.M. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: HAMILTON, D.W.; GREEP, R.O. (eds). *Handbook of Physiology*. Washington: American Physiological Society, 1975. v.5. p.303-317 apud ABE, K. et al. Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional difference of the principal cells. *Arch.histol.jap.*, v.46, n.1, p.51-68, 1983.
- 12 BEHMER, O.A. et al. *Manual de técnicas para Histologia normal e patológica*. São Paulo: Edart, 1976. p.28-29.
- 13 BENDITT, J.M. Current contraceptive research. *Fam.Plan.Persp.*, v.12, n.3, p.149-155, 1980 apud POPULATION REPORTS. *Esterilização masculina*. Baltimore: The Johns Hopkins University, n.4, dez.1984. p.D-24. Série D.

- 14 BENSON, W.R.; CLARE, F.S. Regenerative changes and spermatoc granulomas in the rat testis after treatment with dl-ethionine. *Am.J.Pathol.*, v.49, p.981, 1966 apud NEAVES, W. B. Leydig cells. In: GREEP, R. O.; KOBLINSKY, M. A. *Frontiers in reproduction and fertility control*. Cambridge: MIT Press, 1977. p.321-337.
- 15 BERGH, A. Morphological signs of a direct effect of experimental cryptorchidism on the Sertoli cells in rats irradiated as fetuses. *Biol.Reprod.*, v.24, p.145-152, 1981 apud KERR, J.B. et al. Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *Anat.Rec.*, v.235, n.4, p.547-559, 1993.
- 16 BERNARDI, H.H.; WASICKY, M. Algumas pesquisas sobre a espinheira-santa ou cancerosa, *Maytenus ilicifolia* Martius usada como remédio popular no Rio Grande do Sul. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Santa Maria, 1959, 45p. apud CARLINI, E.A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp (espinheira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E.A. *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia "Espinheira-santa" e outras)*. Brasília: CEME/ AFIP, 1988. p.21-35.
- 17 BEYLER, A.L. et al. The selective testicular effects of certain bis-(dichloacetyl)diamines. *Endocrinology*, v.69, p.819-833, 1961 apud REPORTS ON POPULATION. *Family Planning*. New York: The Population Council, n.1, jul.1971, p.17.
- 18 BHARGAVA, S.K. Antifertility agents from plants. *Fitoterapia*, v.59, n.3, p.163-177. 1988.
- 19 BHIWGADE, D.A. et al. Effect of cyproterone acetate on testis of albino rats: Ultrastructural and biochemical approach. *Indian J. Exp. Biol.*, v.28, n.3, p.201-207, 1990.
- 20 BILLIS, A. Effects on rabbit spermatogenesis following orthostatic collapse light microscope qualitative and quantitative studies. *Andrologia*, v.10, n.6, p.491-497, 1978.
- 21 BILLIS, A. Biópsia do testículo no estudo da infertilidade masculina: padrões histológicos. *Rev.Ass.Med.Brasil.*, v.28, n.1, p.26-28, 1982.
- 22 BORIS, A. et al. Permanent sterility in the male rat after a single dose of a pipicolino-methylhydroxyindane. *J. Reprod. Fertil.*, v.37, n.2, p.441-442, 1974.
- 23 BORIS, A. et al. Antitesticular and antifertility activity of a pipicolinomethylhydroxyindane in rats. *J. Reprod. Fertil.*, v.38, n.2, p.387-394, 1974.
- 24 BROWN-WOODMAN, P.D.C.; WHITE, I.G. Effect of alpha-chlorohydrin on cauda epididymis and spermatozoa of the rat and general physiological status. *Contraception*, v.11, n.1, p.69-78, 1975.

- 25 BRYAN, J.H.D. Spermatogenesis revisited. I. On the presence of multinucleate spermatogenic cells in the seminiferous epithelium of the mouse. *Z.Zellforsch.*, v.112, p.333-349, 1971 apud BRYAN, J.H.D.; WOLOSEWICK, J.J. Spermatogenesis revisited. II. Ultrastructural studies of spermiogenesis in multinucleate spermatids of the mouse. *Z.Zellforsch.*, v.138, n.2, p.155-169, 1973.
- 26 BRYAN, J.H.D.; WOLOSEWICK, J.J. Spermatogenesis revisited. II. Ultrastructural studies of spermiogenesis in multinucleate spermatids of the mouse. *Z.Zellforsch.*, v.138, n.2, p.155-169, 1973.
- 27 BUNTING, G. The correct names of two common Dieffenbachias. *Baileya*, v.10, p.145-146, 1962 apud PLOWMAN, T. Folk uses of new world aroids. *Econ.Bot.*, v.23, n.2, p.97-122, 1969.
- 28 BUSTOS-OBREGON, E.; FEITO, R. The effect of vinblastine sulfate on rat spermatogenesis. *Arch.Biol.*, v.85, n.3, p.353-364, 1974.
- 29 CAFLISCH, C.R.; DUBOSE, T.D., Jr. Effect of alfa-chlorohydrin on in situ pH in rat testis and epididymis. *Contraception*, v.41, n.2, p.207-212, 1990.
- 30 CAIUS, J. F. J. *Bombay Nat. Hist. Soc.*, v.41, p.607, 1940 apud DE LASZLO, H.; HENSHAW, P.S. Plant materials used by primitive peoples to affect fertility. *Science*, v.119, n.3083, p.626-631, 1954.
- 31 CARLINI, E.A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp (espinheira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E.L.A. *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia "Espinheira-santa" e outras)*. Brasília: CEME/ AFIP, 1988. p.21-35.
- 32 CARLINI, E.A.; FROCHTENGARTEN, M.L. Toxicologia clínica (fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E.L.A. *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia "Espinheira-santa" e outras)*. Brasília: CEME/ AFIP, 1988. p.67-73.
- 33 CARLINI, E.A et al. Toxicologia pré-clínica da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E.L.A. *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia "Espinheira-santa" e outras)*. Brasília: CEME/ AFIP, 1988. p.49-66.
- 34 CASEY, R.C.D. Alleged antifertility plants of India. *Indian J.Med.Sciences*, v.14, p.590-600, 1960 apud WENIGER, B. et al. Plants of Haiti used as antifertility agents. *J.Ethnopharmacol.*, v.6, n.1, p.67-84, 1982.
- 35 CHANDLER, R.F. et al. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. *Econ. Bot.*, v.36, n.2, p.203-223, 1982.

- 36 CHANDLER, R. F. et al. Herbal remedies of the maritime Indians: sterols and triterpenes of *A.millefolium* L. (yarrow). *J.Pharm.Sci.*, v.71, n.6, p.690-693, 1982.
- 37 CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol.Rev.*, v.52, p.198-236, 1972 apud HESS, R.A. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol.Reprod.*, v.43, n.3, p.525-542, 1990.
- 38 CLERMONT, Y. Spermatogenesis. In: GREEP, R.O.; KOBLINSKY, M.A. *Frontiers in reproduction and fertility control*. Cambridge: MIT Press, 1977. p.293-301.
- 39 CONWAY, G.A.; SLOCUMB, J.C. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. *J.Ethnopharmacol.*, v.1, p.241-261, 1979 apud WENIGER, B. et al. Plants of Haiti used as antifertility agents. *J.Ethnopharmacol.*, v.6, n.1, p.67-84, 1982.
- 40 COOPER, E.R.A. et al. Effects of alpha-chlorohydrin and related compounds on the reproductive organs and fertility of the male rat. *J.Reprod.Fertil.*, v.38, n.2, p.379-386, 1974.
- 41 CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926 e 1931. v.1 e 2 apud PLOWMAN, T. Folk uses of new world aroids. *Econ.Bot.*, v.23, n.2, p.97-122, 1969.
- 42 COULSON, P. B. et al. Short-term metabolic effects of the antifertility agent, gossypol, on various reproductive organs of male mice. *Int.J.Androl.*, v.3, n.5, p.507-518, 1980.
- 43 COULSTON, F. et al. The biologic actions of a new series of bis(dichloroacetyl)diamines. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, v.2, p.275, 1960 apud PAULSEN, C.A. Regulation of male fertility. In: GREEP, R.O.; KOBLINSKY, M.A. *Frontiers in reproduction and fertility control*. Cambridge: MIT Press, 1977. p.458-465.
- 44 COUTINHO, E.M. Clinical studies with gossypol. *Arch.Androl.*, v.9, p.37-38, 1982 apud HAIDER, S. G. et al. Reversible changes in rat spermatogenesis induced by an antifertility substance (Gossypol). A histochemical report. *Acta histochem.*, v.7, n.2, p.185-191, 1985.
- 45 CROVETTO, R.M. Plantas reguladoras de la fecundidad utilizadas en la medicina popular del nordeste argentino. *Am.Ind.*, v.47, n.2, p.279-293, 1987.
- 46 DAHL, E.; TVETER, K. J. The ultrastructure of the accessory sex organs of the male rat: The effect of cyproterone acetate. *J. Endocrinol.*, v.62, n.2, p.251-256, 1974.
- 47 DANTAS, M.M.; MELLO, M.L.S. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans*

Klug, induced by thermal shocks. *Rev.Bras.Genet.*, v.15, n.3, p.509-519, 1992.

- 48 DE LASZLO, H.; HENSHAW, P.S. Plant materials used by primitive peoples to affect fertility. *Science*, v.119, n.3083, p.626-631, 1954.
- 49 DETTER, R. Germination inhibitors as drugs? Growth-inhibitory effect of an extract of chamomile and milfoil flowers. *Pharm.Ztg.*, v.126, n.23, p.1140-1142, 1981. *Chem. Abstr.*, v.95: 36307f.
- 50 DIXIT, V.P.; BHARGAVA, S.K. *Andrologia*, v.15, p.486, 1983 apud BHARGAVA, S. K. Antifertility agents from plants. *Fitoterapia*, v.59, n.3, p.163-177, 1988.
- 51 DIXIT, V.P.; LOHIYA, N.K. Inhibition of spermatogenesis in gerbil (*Meriones hurrianus*), hedgehog (*Hemiechinus auritus collaris*) and mice after methallibure (ICI 33828) treatment. *Arch.Biol.*, v.85, n.3, p.343-352, 1974.
- 52 _____. Effects of danazol on the pituitary-gonadal axis in male gerbils and mice. *Fertil.Steril.*, v.26, n.1, p.68-73, 1975.
- 53 _____. Observations on the effects of alpha-chlorohydrin on the testes and pituitary gonadotrophs of gerbil (*Meriones hurrianus*) and rat. *Acta Anat.*, v.96, n.1, p.25-34, 1976.
- 54 DIXIT, V.P. et al. Effects of alpha-chlorohydrin and gonadectomy on the adenohipophysial cells of male rats and gerbils. *J.Reprod.Fertil.*, v.38, n.1, p.185-188, 1974.
- 55 DONALDSON, A. et al. Inhibition by gossypol of testosterone production by mouse Leydig cells in vitro. *Contraception*, v.31, n.2, p.165-172, 1985.
- 56 DUKE, J. A. *Handbook of medicinal herbs*. Boca Raton: CRC Press, 1987. 677p.
- 57 DVORJETSKI, M. La plante stérilisante *Caladium seguinum* et ses propriétés pharmacodynamiques. *Rev.Fran.Gyn.Obst.* v.53, n.2, p.139-151, 1958 apud PLOWMAN, T. Folk uses of new world aroids. *Econ.Bot.*, v.23, n.2, p.97-122, 1969.
- 58 EAST, J. The effect of certain plant preparations on the fertility of laboratory mammals. 1. *Polygonum hydropiper* L. *J. Endocrinol.*, v.12, n.4, p.252-260, 1955.
- 59 FALK, A.J. et al. Isolation and identification of three new flavones from *A.millefolium*. *J.Pharm.Sci.*, v.64, n.11, p.1838-1842, 1975.
- 60 FANG, V.S.; ANDERSON, W.A. Studies on the antitesticular action of DL-6-(N-2-pipecolinomethyl)-5-hydroxyindane (PMHI) in the rat. *Endocrinology*, v.99, n.2, p.358-370, 1976.
- 61 FAWCETT, D. W. The structure of the spermatozoon. In: GREEP, R.O.; KOBLINSKY,

M.A. **Frontiers in reproduction and fertility control**. Cambridge: MIT Press, 1977. p.353-378.

- 62 _____. The ultrastructure and functions of the Sertoli cell. In: GREEP, R.O.; KOBLINSKY, M.A. **Frontiers in reproduction and fertility control**. Cambridge: MIT Press, 1977. p.302-320.
- 63 FLICKINGER, C.J. Effects of clomiphene on the structure of the testis, epididymis and sex accessory glands of the rat. *Am.J.Anat.*, v.149, n.4, p.533-562, 1977.
- 64 _____. Effects of testosterone enanthate on the structure of the male reproductive tract of the rat. *Anat.Rec.*, v.192, n.4, p.555-584, 1978.
- 65 FLICKINGER, C.J.; LOVING, C.K. Fine structure of the testis and epididymis of rats treated with cyproterone acetate. *Am.J.Anat.*, v.146, n.4, p.369-384, 1976.
- 66 FLORES, M.; FAWCETT, D. M. Ultrastructural effects of the antispermatogenic compound WIN-18446 (bisdichloroacetyldiamine). *Anat.Rec.*, v.172, p.310, 1972 apud NEAVES, W.B. Leydig cells. In: GREEP, R.O.; KOBLINSKY, M.A. **Frontiers in reproduction and fertility control**. Cambridge: MIT Press, 1977. p.321-337.
- 67 FONT QUER, P. *Plantas medicinales*. Barcelona: Labor, 1962 apud PLOWMAN, T. Folk uses of new world aroids. *Econ.Bot.*, v.23, n.2, p.97-122, 1969.
- 68 FRASER, H.M. A new class of contraceptives? *Nature*, v.296, n.5856, p.391-392, 1982.
- 69 GARCIA, S.M.L. Espermatogênese. In: GARCIA, S.M.L. et al. *Embriologia*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1991. p.19-31.
- 70 GHADIALLY, F.N. *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*. 3.ed. London: Butterworths, 1988. v.2. p.1176-1201.
- 71 GHOSH, S. et al. Further observations of stage-specific effect seen after short-term hypophysectomy in the rat. *Tissue Cell*, v.23, p.613-630, 1991 apud KERR, J.B. et al. Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *Anat.Rec.*, v.235, n.4, p.547-559, 1993.
- 72 GIRIDHARAN, N. et al. Inhibition of rat testis lactic dehydrogenase-X activity by gossypol. *Contraception*, v.26, n.6, p.607-616, 1982.
- 73 GOMES, W.R. et al. Serum gonadotropin and testosterone levels during loss and recovery of spermatogenesis in rats. *Endocrinology*, v.93, n.4, p.800-809, 1973.
- 74 GOMEZ-SERRANILLOS, M. et al. Phytochemical study of *M.senegalensis* (Lamk) Exell. *An.Bromatol.*, v.31, n.2, p.180-188, 1979.

- 75 GUPTA, S. et al. Antispermatogetic effect of embelin, a plant benzoquinone, on male albino rats in vivo and in vitro. *Contraception*, v.39, n.3, p.307-320, 1989.
- 76 GUPTA, S. et al. Effects of embelin, an antifertility agent, on the lipid metabolism of male albino rats. *Fitoterapia*, v.60, n.4, p.331-338, 1989.
- 77 GUPTA, S. et al. Inhibition of reproductive tissue carbohydrate metabolism and reversibility of the effects of embelin, a plant benzoquinone of antifertility potential. *Fitoterapia*, v.61, n.2, p.133-144, 1990.
- 78 HAIDER, S.G. et al. Reversible changes in rat spermatogenesis induced by an antifertility substance (Gossypol). A histochemical report. *Acta histochem.*, v.7, n.2, p.185-191, 1985.
- 79 HEINERT, G.; TAUBERT, H.D. Effect of cyproterone and cyproterone acetate on testicular function in the rat. A karyometric study. *Endokrinologie*, v.61, n.2, p.168-178, 1973.
- 80 HESS, R.A. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol.Reprod.*, v.43, n.3, p.525-542, 1990.
- 81 HESS, R.A. et al. Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol.Repr.*, v.43, n.3, p.517-524, 1990.
- 82 HNATYSZYN, O. et al. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales paraguayas. I. Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklorica. *Rev.Soc.Cient.*, v.14, n.1/2, p.23-39, 1974.
- 83 HOFFER, A. Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and ME study. *Biol. Reprod.*, v.28, n.4, p.1007-1020, 1983.
- 84 HOMM, R. E. et al. The antispermatogetic effects of 5-thio-D-glucose in male rats. *Biol.Reprod.*, v.17, n.5, p.697-700, 1977.
- 85 HUANG, A.B. et al. Maytansine inhibits nucleotide binding at the exchangeable site of tubulin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v.128, n.3, p.1239-1246, 1985.
- 86 HUNDAL, R.S.; MANGAT, H.K. Effect of alpha-chlorohydrin on biochemical composition of testis and accessory reproductive organs in adult male rats. *Indian J.Exp.Biol.*, v.16, n.12, p.1278-1279, 1978.
- 87 HUNT, S.; MITTWOCH, U. Effects of gossypol on sperm counts in two inbred strains of mice. *J.Reprod.Fert.*, v.70, n.1, p.341-345, 1984.
- 88 ITOKAWA, H. et al. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, v.30, n.11,

p.3713-3716, 1991.

- 89 IVANOV, C.; YANKOV, L. Composition of *A.millefolium*. I. Preparation of the total extracts and composition of the part of the alcoholic extracts soluble in alcohol and water. *God.Vissh.Khimikotekhnol.Inst.*, v.14, n.3, p.195-222, 1967. *Chem.Abstr.*, v.77: 111471p.
- 90 _____. Composition of *A.millefolium*. II. Composition of the parts soluble in water and insoluble in alcohol. *God.Vissh.Khimikotekhnol.Inst.*, v.14, n.3, p.223-241, 1967. *Chem.Abstr.*, v.77: 111472q.
- 91 _____. Composition of *A.millefolium*. III. Composition of the acidic, water-insoluble part of the alcoholic extract. *God.Vissh.Khimikotekhnol.Inst.*, v.14, n.2, p.61-72, 1967. *Chem.Abstr.*, v.77: 111473r.
- 92 _____. Composition of *A.millefolium*. V. Composition and structure of the components of neutral fraction insoluble in the aqueous part of the alcoholic extract. *God.Vissh.Khimikotekhnol.Inst.*, v.14, n.2, p.73-101, 1967. *Chem.Abstr.*, v.77: 111474s.
- 93 JOHNSON, R.K. et al. Stathmokinetic and therapeutic effects of maytansine in mice bearing P388 and L1210 leukemias. *Biochem.Pharmacol.*, v.27, n.15, p.1973-1975, 1978.
- 94 JONES, A.R. The antifertility actions of alpha-chlorohydrin in the male. *Life Sci.*, v.23, n.16, p.1625-1646, 1978.
- 95 JOSHI, B.C. et al. Antifertility effects of chronically administered *Malvaviscus conzattii* flower extract on male albino mice. *Planta Med.*, v.41, n.3, p.274-280, 1981.
- 96 KALLA, N.R.; VASUDEV, M. Studies on the male antifertility agent-gossypol acetic acid. II. Effect of gossypol acetic acid on the motility and ATPase activity of human spermatozoa. *Andrologia*, v.13, n.2, p.95-98, 1981.
- 97 KALLA, N.R. et al. Studies on the male antifertility agent - gossypol acetic acid. V. Effects of gossypol acetic acid on the fertility of male rats. *Andrologia*, v.14, n.6, p.492-500, 1982.
- 98 KAUR, S.; GURAYA, S.S. Biochemical observation on the protein and nucleic acid metabolism of the rat testis and epididymis after treatment with low doses of alpha - chlorohydrin. *Int. J. Fertil.*, v.26, n.1, p.8-13, 1981.
- 99 _____. Effects of low doses of alpha - chlorohydrin on the dehydrogenases and oxidases of rat epididymal epithelium and sperms: A correlative histochemical and biochemical study. *Andrologia*, v.13, n.3, p.225-231, 1981. .
- 100 _____. Effect of low doses of alpha-chlorohydrin on the dehydrogenases and oxidases of rat

testis: A histochemical study. *Andrologia*, v.14, n.6, p.543-547, 1982.

- 101 KERR, J.B. et al. Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *Anat.Rec.*, v.235, n.4, p.547-559, 1993.
- 102 KHOLKUTE, S. D. Effect of *Hibiscus rosa sinensis* on spermatogenesis and accessory reproductive organs in rats. *Planta Med.*, v.31, n.2, p.127-135, 1977.
- 103 KHOLKUTE, S.D.; UDUPA, K.N. *Ind.J.Exper.Biol.*, v.14, p.175, 1976 apud KHOLKUTE, S.D. Effect of *Hibiscus rosa sinensis* on spermatogenesis and accessory reproductive organs in rats. *Planta Med.*, v.31, n.2, p.127-135, 1977.
- 104 _____. *J.Res.Indian Med. Yoga Homeophath.*, v.13, p.107, 1978 apud BHARGAVA, S. K. Antifertility agents from plants. *Fitoterapia*, v.59, n.3, p.163-177. 1988.
- 105 KHOLKUTE, S. D. et al. *J. Res. Indian Med. Yoga Homeophath.*, v.11, p.106, 1976 apud BHARGAVA, S.K. Antifertility agents from plants. *Fitoterapia*, v.59, n.3, p.163-177. 1988.
- 106 _____. Screening of indigenous medicinal plants for antifertility potentiality. *Planta Med.*, v.29, n.2, p.151-155, 1976.
- 107 KIM, I; WALLER, D.P. Specific inhibition of the testicular mitochondrial respiratory chain in vitro by gossypol. *J.Androl.*, v.5, n.6, p.424-430, 1984.
- 108 KIM, I. C. et al. Inhibition of lactate dehydrogenase-X by gossypol optical isomers. *J.Androl.*, v.6, n.6, p.344-347, 1985.
- 109 KUBRUSLY, F.S. Ação de cobre e mercúrio sobre estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 1984 apud DANTAS, M.M.; MELLO, M.L.S. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. *Rev.Brasil.Genet.*, v.15, n.3, p.509-519, 1992.
- 110 LAKSHMAN, A.B.; ISAAC, P. Effects of cyproterone acetate on the adenohipophysial cells of male rats. *J. Reprod. Fertil.*, v.32, n.1, p.141-144, 1973.
- 111 LAPA, A.J. Validação de plantas medicinais da medicina tradicional. Trabalho enviado à Reunião Anual RIPRONAMED/Química Fina Farmacêutica/CYTED-D. Assunción, 23 a 27 de agosto de 1992. 4p. datilog.
- 112 LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v.55, p.548-573, 1952.
- 113 _____. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic

- acid-fuchsinsulfurous acid" technique. *Am.J.Anat.*, v.90, n.2, p.167-215, 1952.
- 114 LEE, C.-Y.G. et al. Enzyme inactivation and inhibition by gossypol. *Mol.Cell.Biochem.*, v.47, n.2, p.65-70, 1982.
- 115 LIMA, O.G. de. et al. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev.Inst. Antibióticos*, v.11, n.1, p.35-39, 1971.
- 116 LIN, C.M.E.; HAMEL, E. Effects of inhibitors of tubulin polymerization on GTP hydrolysis. *J.Biol.Chem.*, v.256, n.17, p.9242-9245, 1981.
- 117 LIN, T. et al. Gossypol inhibits testicular steroidogenesis. *Fertil.Steril.*, v.35, n.5, p.563-566, 1981.
- 118 LINDE, R. et al. Reversible inhibition of testicular steroidogenesis and spermatogenesis by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in normal men: an approach toward the development of a male contraceptive. *New England J.Med.*, v.305, n.12, p.663-667, 1981 apud POPULATION REPORTS. Esterilização masculina. Baltimore: The Johns HopkinsUniversity, n.4, dez.1984. p.D - 24.
- 119 LOBL, T. J. et al. Pharmacologic agents producing infertility by direct action on the male reproductive tract. In: ZATUCHNI, G.L. et al. *Research frontiers in fertility regulation*. New York: Harper and Row, 1980. p.146-168.
- 120 LOBL, T.J.; PORTEUS, S.E. Antispermatic effects of 5-aminoindazole in rats. *J.Repr.Fert.*, v.50, n.2, p.371-372, 1977.
- 121 LOPES DE FARIA, J. et al. *Patologia Geral*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 432p.
- 122 LU, Z. et al. Studies of antifertility effect of testosterone undecanoate in combination with danazol in male rats. *Acta Acad. Med. Sin.*, v.11, n.3, p.190-194, 1989.
- 123 MADAUS, G.; KOCH, F.E. Tierexperimentelle Studien zur Fragen der medikamentösen Sterilisierung. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*, v.109, p.68-87, 1941 apud PLOWMAN, T. Folk uses of new world aroids. *Econ.Bot.*, v.23, n.2, p.97-122, 1969.
- 124 MAJUMDAR, S. K. et al. Reproduction and teratogenic studies of 5-thio-D-glucose in mice. *J.Hered.*, v.70, n.2, p.142-145, 1979.
- 125 MAJUMDAR, S. K.; UDELSMAN, R. Fine structure of mouse testes following intraperitoneal treatment with 5-thio-D-glucose. *J. Hered.*, v.70, n.3, p.194-198, 1979.
- 126 MANDICH, L. et al. Phytochemical screening of medicinal plants studies of flavonoids.

Rev. Latinoamer. Quim., v.15, n.2, p.80-82, 1984.

- 127 MARGULIS, L. Colchicine - sensitive microtubules. *Int.Rev. Cyt.*, v.34, p.333-359, 1973.
- 128 MCCLARTY, G.A. et al. Ribonucleotide reductase: An intracellular target for the male antifertility agent, gossypol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.133, n.1, p.300-305, 1985.
- 129 MEISTRICH, M.L. et al. Spermatogenesis in hybrid mice treated with oestrogen and testosterone. *J.Repr.Fert.*, v.50, n.1, p.75-81, 1977.
- 130 MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev.Bras.Genet.*, v.12, p.485-498 apud DANTAS, M.M.; MELLO, M.L.S. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. *Rev.Bras.Genet.*, v.15, n.3, p.509-519, 1992.
- 131 MENEZES, M. G.; CARLINI, E. A. Efeitos farmacológicos da administração aguda da espinheira-santa (*Milicifolia*). In: CARLINI, E.L.A. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* "Espinheira-santa" e outras). Brasília: CEME/ AFIP, 1988. p.37-48.
- 132 MILONE, M. et al. Effects of prolonged treatment with cyproterone acetate on hydrolytic enzymes in seminal vesicles of the mouse. *Andrologia*, v.12, n.6, p.510-512, 1980.
- 133 MORAES, G.E.S. *Espemocitograma*. Porto Alegre: Médica Missau, 1994. 195p.
- 134 MORRIS, I.D. et al. Inhibition for testicular lactate dehydrogenase-X from laboratory animals and man by gossypol and its isomers. *J.Reprod.Fertil.*, v.77, n.2, p.607-612, 1986.
- 135 MORS, W. B.; RIZZINI, C. T. *Useful plants of Brazil*. San Francisco: Holden-Day, 1966 apud PLOWMAN, T. Folk uses of new world aroids. *Econ.Bot.*, v.23, n.2, p.97-122, 1969.
- 136 MORSE, H.C. et al. Effect of cyproterone acetate on sperm concentration, seminal fluid volume, testicular cytology and levels of plasma and urinary ICSH, FSH and testosterone in normal men. *J.Reprod.Fertil.*, v.32, p.365-378, 1973.
- 137 MOWSZOWICZ, I. et al. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: Comparision with nonprogestational antiandrogens. *Endocrinology*, v.95, n.6, p.1589-1599, 1974.
- 138 NAKAMURA, M.; HALL, P. F. Effect of 5-thio-D-glucose on protein synthesis in vitro by various types of cells from rat testes. *J.Reprod.Fertil.*, v.49, n.2, p.395-397, 1977.
- 139 NATIONAL COORDINATING GROUP ON MALE ANTIFERTILITY AGENTS (CHINA).

CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. New York: Academic Press, 1959. v.2. p.1-49.

- 153 PATANELLI, D. J. Discussion: Pharmacologic and hormonal method in male fertility control. In: ZATUCHNI, G.L. et al. **Research frontiers in fertility regulation**. New York: Harper & Row, 1980. p.187-194.
- 154 PAULSEN, C.A. Regulation of male fertility. In: GREEP, R.O.; KOBLINSKY, M.A. **Frontiers in reproduction and fertility control**. Cambridge: MIT Press, 1977. p.458-465.
- 155 PAULSEN, C.A. et al. Male contraception: clinical trials. In: MISHELL, D.R., Jr. (ed.). **Advances in fertility research**. New York: Raven Press, 1982. v.1. p.157-170 apud POPULATION REPORTS. **Anticoncepcionais injetáveis e implantes**. Baltimore: The Johns Hopkins University, n.2, abr.1984. p. K-34, Série K.
- 156 PEARCE, S. et al. Inhibition by gossypol of cyclic AMP production in mouse Leydig cells. **Contraception**, v.34, n.6, p.639-646, 1986.
- 157 PEARCE, S. et al. Site of gossypol inhibition of steroidogenesis in purified mouse Leydig cells. **J.Steroid Biochem.**, v.25, n.5A, p.683-687, 1986.
- 158 PLOWMAN, T. Folk uses of new world aroids. **Econ.Bot.**, v.23, n.2, p.97-122, 1969.
- 159 POPULATION REPORTS. **Anticoncepcionais injetáveis e implantes**. Baltimore: The Johns Hopkins University, n.2, abr.1984. 46 p. Série K.
- 160 _____. **Esterilização masculina**. Baltimore: The Johns Hopkins University, n.4, dez.1984. 47p. Série D.
- 161 PRASAD, M.R.N.; DICKZFALUSY, E. Gossypol. **Int.J.Androl.**, suppl., v.5, p.53-70, 1982 apud HUNT, S.; MITTWOCH, U. Effects of gossypol on sperm counts in two inbred strains of mice. **J.Reprod.Fert.**, v.70, n.1, p.341-345, 1984.
- 162 PURANDARE, T. V. et al. **Indian J.Exp.Biol.**, v.17, p.935, 1979 apud BHARGAVA, S. K. Antifertility agents from plants. **Fitoterapia**, v.59, n.3, p.163-177. 1988.
- 163 PURVIS, K. et al. Sites of action of cyproterone and cyproterone acetate in the immature male rat. **Int.J.Androl.**, v.1, n.3, p.279-296, 1978.
- 164 QIAN, S.Z. **Trypterygium wilfordii**, a chinese herb effective in male fertility regulation. **Contraception**, v.36, n.3, p.335-345, 1987.
- 165 QIAN, S.-Z. et al. Effect of **Trypterygium wilfordii** on the fertility of rats. **Contraception**, v.33, n.2, p.105-110, 1986.