

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ELANE CRISTINA SILVA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
***Pradosia huberi* Ducke SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E**
ÓRGÃOS VITAIS DE RATOS E SUA PROLE

João Pessoa - PB
Fevereiro - 2012

ELANE CRISTINA SILVA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Pradosia huberi Ducke SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E
ÓRGÃOS VITAIS DE RATOS E SUA PROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

João Pessoa - PB

Fevereiro - 2012

S237a Santos, Elane Cristina Silva dos.

Avaliação do potencial tóxico do extrato hidroalcoólico de Pradosia huberi Ducke sobre o sistema reprodutor masculino e órgãos vitais de ratos e sua prole / Elane Cristina Silva dos Santos.-- João Pessoa, 2012.

121f. : il.

Orientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. Plantas Medicinais. 3. Pradosia Huberi. 4. Fertilidade - ratos. 5. Toxicidade reprodutiva.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

ELANE CRISTINA SILVA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Pradosia huberi Ducke SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E
ÓRGÃOS VITAIS DE RATOS E SUA PROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

**Profa. Dra. Jane Sheila Higino
(Universidade Federal do Pernambuco)
Examinadora externa**

**Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna**

Dedicatória

A Deus,
mestre soberano, pelo dom da vida , amparo e amor incondicionais e por mais
uma oportunidade de crescimento e aprendizado.

Aos meus amados pais,
Fernando Pereira dos Santos e Maria Eliane Silva dos santos, pelo apoio,
encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces da minha
história.

À minha filha,
Maria Antonella Landim Macêdo Silva, pela oportunidade de experimentar a mais
pura forma de amor.

Aos meus irmãos,
Fernanda Silva dos Santos e Jobson Silva dos Santos, que sempre estiveram ao
meu lado, dando-me força e apoio.

Ao meu esposo,
Cibério Landim Macêdo, por todo apoio, amor e compreensão e por ter sido o
meu maior incentivador na concretização deste sonho.

Agradecimientos

A minha família, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

A minha orientadora Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, exemplo de sabedoria e simplicidade, por confiar, acreditar e apoiar sempre o meu trabalho, tornando possível sua realização.

À Profa. Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá, pela fundamental orientação para a realização deste trabalho e por ter contribuído diretamente com o meu aprendizado científico.

À Profa. Dra. Alessandra Azevedo Nascimento de Medeiros, pelo fornecimento do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi*, objeto de estudo neste trabalho.

À querida amiga Aldeíde Rocha, pelo acompanhamento de bancada, pela amizade e apoio.

Às amigas Flávia Luana Santos e Priscylla Antunes, pelo companheirismo e apoio indispensável na execução dos experimentos.

Aos amigos João Carlos Pita e Aline Xavier, pelo apoio, incentivo e pela colaboração na realização das análises bioquímicas e hematológicas.

A todos os colegas do Laboratório de Ensaaios Toxicológicos, pela força e incentivo.

Ao amigo José Crispim Duarte, pela sua amizade, competência e auxílio técnico no biotério.

A Luís Cordeiro da Silva e Adriano Soares Cordeiro pela colaboração no Biotério.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação, Bagnólia A. da Silva, Marianna V. S. Castello Branco, Margareth de Fátima F. M. Diniz; Márcia Rosa de Oliveira, Isac A. de Medeiros, José Maria B. Filho, Liana C. S. L. de Moraes, Rui O. Macêdo, entre outros, muito obrigada.

Aos meus amigos: Célia Rejane, Fábio Tenório e Janiza Costa, pela amizade e incentivo.

À direção do então Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB), hoje Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB) pelo apoio prestado.

Aos demais funcionários do CBiotec, que contribuíram desde a limpeza até a segurança.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, nas pessoas dos Profs. Maria de Fátima Agra e Josean Fachine Tavares.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico científico e financeiro.

A todos os amigos de turma do mestrado 2010 e àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Elane Cristina Silva dos Santos

Resumo

RESUMO

Desde a antiguidade as plantas são utilizadas com fins medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças. *Pradosia huberi* Ducke (Sapotaceae) é uma planta medicinal comumente usada pelas comunidades amazônicas por suas atividades gastroprotetora e antiulcerogênica. Considerando-se o uso popular dessa espécie e a presença de compostos bioativos com potencial tóxico sobre o sistema reprodutor masculino, além da inexistência de estudos científicos de toxicidade reprodutiva dessa espécie, esse trabalho teve como propósito investigar os efeitos tóxicos de *P. huberi* sobre a fertilidade, órgãos vitais e prole de ratos. Ratos Wistar foram divididos em grupos controle e tratados (n = 15). Os animais dos grupos controle e tratados receberam, respectivamente, água destilada e o extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *P. huberi* (EHA-PH) nas doses de 1,22, 6,1 e 30,5 mg/kg de peso corporal, por via oral, uma vez ao dia, por 63 dias, período que compreende o ciclo espermatogênico completo dessa espécie mais o período de trânsito epididimário, e foram eutanasiados no 64º dia. Para a investigação do potencial tóxico do EHA-PH sobre o sistema reprodutor de ratos, os seguintes parâmetros foram avaliados: ocorrência de sinais clínicos gerais de toxicidade, consumo diário de água e ração, análises bioquímicas e hematológicas, peso corporal, de órgãos vitais, do sistema reprodutor e das glândulas sexuais acessórias, produção de espermatozoides, comportamento sexual, genotoxicidade e desenvolvimento geral, reflexológico e comportamental da prole. A exposição oral ao EHA-PH nas doses de 1,22 e 6,1 mg/kg não alterou o peso corporal de ratos, entretanto a administração da dose de 30,5 mg/kg causou redução do peso corporal dos animais a partir do 35º dia de tratamento. Esse achado foi corroborado pela diminuição na ingestão de ração por esses animais. O peso de rins, fígado, pulmão, cérebro, hipófise, testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata dos animais tratados não se alteraram em relação aos pesos dos animais do grupo controle. A administração do extrato não causou mudanças significativas no perfil bioquímico e hematológico dos ratos. A produção de gametas e a sua morfologia não diferiram entre os grupos controle e tratados. O tratamento com o EHA-PH também não alterou o comportamento sexual masculino, porém provocou um aumento de 14,3 % e 10,8% nos índices de perdas pré-implantação e uma redução de 14,3 % e 10,8% nos índices de implantação, além de uma redução de 5,6% e 8,2% nos índices de perdas pós-implantação das ratas acasaladas com ratos que receberam 6,1 mg/kg e 30,5 mg/kg do EHA-PH, respectivamente. Anormalidades morfológicas foram observadas em natimortos descendentes de progenitoras acasaladas com ratos expostos à dose de 30 mg/kg do EHA-PH. O desenvolvimento geral, reflexológico e comportamental da prole não foram alterados pelo tratamento. Os resultados indicam uma possível ação tóxica do EHA-PH em ratos Wistar, com indícios de efeito mutagênico e adverso no desenvolvimento fetal, evidenciado no modelo experimental estudado.

Palavras-chave: *Pradosia huberi*, fertilidade, ratos, toxicidade reprodutiva.

Abstract

ABSTRACT

Since ancient times plants are used for medicinal purposes to treat, cure and prevention diseases. *Pradosia huberi* Ducke (Sapotaceae) is a medicinal plant commonly used by Amazonian communities for their antiulcerogenic and gastroprotective activities. Considering the popular use of this species, the presence of bioactive compounds with potential toxic effects on the male reproductive system, and the lack of scientific studies on the reproductive toxicity, this work aimed to investigate the toxic effects of *P. huberi* on fertility, offspring and vital, reproductive organs of rats. Wistar rats were divided into control and treated groups (n = 15). The control and treated groups received distilled water and hydroalcoholic extract of the stem bark of *P. Huberi* (PH-EHA), respectively, at doses of 1.22, 6.1 and 30.5 mg/kg body weight, orally and once daily, for 63 days, a period that correspond to the complete spermatogenic cycle of this species and the period of epididymal transit. The animals were killed on day 64. To investigate the toxic potential of PH-EHA on the reproductive system of rats the following parameters were evaluated: occurrence of clinical signs of general toxicity, daily consumption of water and food, biochemical and hematological tests, body weight, weight of vital organs, the reproductive organs and the accessory sex glands, sperm production, sexual behavior, genotoxicity and general development, and behavior of the offspring. The oral exposure to PH-EHA at doses of 1.22 and 6.1 mg/kg did not alter the body weight of rats, though the dose of 30.5 mg/kg caused a reduction in body weight of animals from the 35th day of treatment. This finding was corroborated by the decrease in food intake by these animals. The weight of kidneys, liver, lung, brain and pituitary, the testis, epididymis, seminal vesicles and prostate of the treated animals did not significantly change in relation to the weights of the control group. The administration of the extract did not cause significant changes in the hematologic and biochemical profile of rats. The production of gametes and their morphology did not differ between control and treated groups. Treatment with PH-EHA did not affect male sexual behavior, but caused an increase of 14.3% and 10.8% in the pre-implantation loss index, a reduction of 14.3% and 10.8% in implantation index, and a reduction of 5.6% and 8.2% in the post-implantation loss index of female rats mated with rats treated with 6.1 mg/kg and 30.5 mg/kg of PH-EHA, respectively. Morphological abnormalities were observed in stillborn offspring from dams mated with rats exposed to 30 mg/kg of PH-EHA. The general development, Reflexology and behavioral of the offspring were not affected by treatment. The results indicate a possible toxic action of EHA-PH in Wistar rats, with evidence of mutagenic and adverse effect on fetal development, as evidenced in the experimental model studied.

Keywords: *Pradosia huberi*, fertility, rats, reproductive toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Pradosia huberi</i> (Ducke) Ducke na reserva florestal do IEPA no município de Porto Grande – AP.....	29
Figura 2 - Estrutura de flavonoides isolados das cascas do caule de <i>Pradosia huberi</i> . Ph-1 (2,3-dihidromiricetina-3-O-raminosídeo acetato) e Ph-2 (2,3-dihidromiricetina-7-O-raminosídeo acetato).....	30
Figura 3 - Desenho esquemático do sistema urogenital de rato.....	33
Figura 4 - Esquema representativo da organização testicular numa secção frontal.....	35
Figura 5 - Esquema da espermatogênese humana.....	40
Figura 6 - Esquema ilustrativo da espermiogênese e do espermatozoide de mamífero.....	41
Figura 7 - Desenho esquemático da regulação hormonal do sistema reprodutor de mamífero, mostrando as vias de estimulação (azul) e inibição (laranja) da função reprodutiva.....	43
Figura 8 - Esquema do processo de preparação do extrato hidroalcoólico de <i>Pradosia huberi</i>	50
Figura 9 - Fetos de progenitoras acasaladas com ratos expostos à dose de 30,5 mg/kg do EHA-PH (A e B) e grupo controle (C). Malformações fetais (A) e (B), com presença de hérnia abdominal (B). Desenvolvimento normal de descendentes de ratos do grupo controle (C).....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Peso de ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.....64

Gráfico 2 - Ingestão diária de ração dos animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.....65

Gráfico 3 - Consumo de água dos animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.....65

Gráfico 4 - Concentração de espermatozoides na secreção da cauda do epidídimo esquerdo de ratos nos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.....70

Gráfico 5 - Número de filhotes nascidos de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....73

Gráfico 6 - Número de implantes de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....74

Gráfico 7 - Número de animais desmamados de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....74

Gráfico 8 - Peso da prole de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil bioquímico de ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.....	66
Tabela 2 - Perfil hematológico de ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.....	67
Tabela 3 - Peso absoluto de órgãos vitais de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.....	68
Tabela 4 - Peso relativo de órgãos vitais de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.....	68
Tabela 5 - Peso absoluto dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.....	69
Tabela 6 - Peso relativo dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.....	69
Tabela 7 - Proporção de espermatozoides normais e anormais de ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.....	71
Tabela 8 - Variáveis reprodutivas em ratas (com gravidez interrompida no 15º dia) acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com EHA-PH.....	72
Tabela 9 - Machos e fêmeas nascidos e desmamados de fêmeas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....	75
Tabela 10 - Variáveis reprodutivas em ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com EHA-PH.....	76
Tabela 11 - Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos descendentes machos (M) e fêmeas (F) de ratas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....	79

Tabela 12 - Desenvolvimento reflexológico (em dia de aparecimento) da prole de ratas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....81

Tabela 13 - Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto na prole de ratas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.....82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABP	Proteína ligante a andrógeno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHA-PH	Extrato hidroalcoólico de <i>Pradosia huberi</i>
EPA	Environmental Protection Agency
e.p.m.	erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá
LH	Hormônio luteinizante
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
US\$	Moeda dos Estados Unidos
VCM	Volume corpuscular médio

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 Considerações gerais sobre <i>Pradosia huberi</i> Ducke.....	28
2.2 Estudos de toxicidade reprodutiva.....	31
2.3 Sistema reprodutor masculino.....	33
2.3.1 Testículos.....	34
2.3.2 Epidídimo e ducto deferente.....	35
2.3.2 Vesículas seminais.....	37
2.3.3 Próstata.....	37
2.3.4 Pênis.....	38
2.4 Espermatogênese.....	39
2.4.1 Espermiogênese.....	40
2.4.2 Controle hormonal da espermatogênese.....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 GERAL	45
3.2 ESPECÍFICO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 MATERIAL.....	47
4.1.1 Material vegetal.....	47
4.1.2 Animais.....	47
4.1.3 Substâncias.....	48
4.1.4 Aparelhagem.....	48
4.2 MÉTODOS.....	49
4.2.1 Preparação do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de <i>Pradosia huberi</i> e das soluções.....	49
4.2.2 Determinação das doses e distribuição dos grupos.....	51
4.2.2.1 Doses e grupos.....	51

4.2.3 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratos Wistar expostos ao extrato hidroalcoólico de <i>Pradosia huberi</i>	52
4.2.3.1 Acasalamento, diagnóstico de prenhez e verificação da fertilidade dos machos.....	53
4.2.3.2 Parâmetros avaliados nos ratos.....	54
4.2.3.3 Parâmetros avaliados nas ratas não tratadas.....	57
4.2.3.4 Parâmetros avaliados na progênie.....	58
4.2.4 Análise estatística.....	61
5 RESULTADOS.....	62
5.1 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratos Wistar expostos ao extrato hidroalcoólico de <i>Pradosia huberi</i>	63
5.1.1 Parâmetros avaliados nos machos.....	63
5.1.1.1 Sinais gerais de toxicidade.....	63
5.1.1.2 Evolução ponderal e consumo de água e ração	63
5.1.1.3 Parâmetros sanguíneos: hematológicos e bioquímicos.....	66
5.1.1.4 Análise macroscópica dos órgãos vitais e reprodutores.....	67
5.1.1.5 Índice de fertilidade.....	70
5.1.2 Parâmetros avaliados nas fêmeas não tratadas.....	71
5.1.2.1 Índices de fertilidade e de reprodução.....	71
5.1.3 Parâmetros avaliados na progênie.....	77
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO A.....	121

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem importantes fontes de compostos bioativos, sendo utilizadas pelos seres humanos, desde a antiguidade, no tratamento de suas doenças e durante muito tempo, por razões econômicas ou culturais, elas foram a principal alternativa de cura da população mundial. A fitoterapia, prática da medicina tradicional ou popular usada como forma alternativa de cuidados com a saúde, evoluiu consideravelmente nos últimos anos entre todos os grupos socioeconômicos da população, sendo atualmente um importante setor econômico no Brasil (SACHETTI, 2010). O setor movimenta globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano e, no Brasil, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões/ano. O principal fator de atração para esse crescimento econômico é o ritmo acelerado das vendas internamente, mais de 15% anuais, contra 4% das vendas dos medicamentos sintéticos. Em toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão (CARVALHO et al., 2008).

Apesar do potencial de expansão dos medicamentos fitoterápicos, as pesquisas realizadas para avaliação da sua eficácia e uso seguro são incipientes, e muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular, sem o conhecimento dos reais efeitos que os mesmos possam exercer no organismo. Os efeitos indesejáveis dos agentes fitoterápicos são menores, quando comparados aos das drogas sintéticas, porém ensaios clínicos revelaram que efeitos adversos também ocorrem com a utilização de plantas medicinais, sendo relevante a realização de estudos toxicológicos bem controlados para comprovar sua segurança e eficácia (CALIXTO, 2000).

Sob o ponto de vista terapêutico, as plantas não devem ser utilizadas indiscriminadamente, pois apesar de servirem como fonte natural de substâncias, elas podem se tornar um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (BARROS; DAVINO, 2003; SÁ, 2003).

Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50 % de todas as drogas em utilização clínica no mundo, sendo que as plantas contribuem com 25 % desse total. Durante os últimos 40 anos, foram isolados

vários compostos de origem vegetal, incluindo *Dioscorea* spp, que originou a diosgenina, a partir da qual derivaram agentes contraceptivos; espécies de *Rauwolfia*, cujos alcaloides, como a reserpina, são utilizados por sua atividade anti-hipertensiva; *Pilocarpus* sp, de onde se obtém a pilocarpina, usada para tratar glaucoma e boca seca; *Catharanthus roseus*, de onde se obtém a vincristina e vinblastina que são agentes anti-cancerígenos; *Cássia* sp, que produz agentes laxantes, e espécies de *Digitalis*, de onde se obtém agentes cardiotônicos para tratamento de doenças do coração (GURIB-FAKIM, 2006). Entretanto, apesar de sua ação terapêutica, as plantas podem apresentar na sua constituição, substâncias capazes de causar efeitos indesejáveis no organismo que variam desde cefaleia, reações de hipersensibilidade, náuseas até efeitos mais danosos como alterações e/ou comprometimentos de órgãos vitais, como fígado e rins, e/ou não-vitais, como é o caso dos órgãos sexuais.

A reprodução é um processo fundamental para a manutenção e perpetuação das espécies (RODRIGUES; FAVARETTO, 1999) e envolve a interação de componentes fisiológicos, psicológicos e comportamentais (LEVIN; RILEY, 2007).

A interferência de agentes tóxicos, como fármacos, mutagênicos e pesticidas sobre o funcionamento do sistema reprodutor masculino e feminino pode levar a distúrbios graves, tanto em seres humanos, quanto em animais (LEMONICA et al., 1996; DALSENTER et al., 1997; PAUMGARTTEN et al., 1997; LANGELOH; MELLO, 1998, THAKUR, et al., 2003). A exposição masculina a esses agentes pode comprometer o processo reprodutivo, através de alterações sobre a espermatogênese, síntese de hormônios sexuais, comportamento sexual e fertilidade (SAVITZ et al., 1994; KIMMEL; CLEGG; CRISP, 1995; DALLEGRAVE, 2003). Dessa forma, os efeitos tóxicos de uma substância sobre o sistema reprodutor masculino podem ser avaliados pelas modificações geradas no eixo hipotálamo-hipófise, nos órgãos reprodutores e nas glândulas sexuais acessórias (FERREIRA; MEDEIROS, 2000; DALLEGRAVE, 2003).

Nas últimas décadas, o interesse da população pelas terapias naturais tem aumentado significativamente, o que justifica o interesse de vários pesquisadores na investigação de plantas que apresentem propriedades

farmacológicas relevantes (SIMONS; GRINWICH, 1989; VIEGAS; BOLSANI; BARREIRO, 2006).

Há relatos de muitas plantas com potencial tóxico sobre o sistema reprodutor, evidenciado por efeitos embriotóxico, teratogênico e abortivo (RODRIGUES, et al., 2011). Estudos realizados com ratas grávidas apontaram o efeito colateral abortivo da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), planta medicinal de comprovada baixa toxicidade e ação antiulcerogênica, anti-inflamatória e antinoniceptiva. Extratos hidroalcoólicos dessa planta mostraram-se abortivos por atuarem no período de pré-implantação dos embriões no útero (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; MONTANARI et al., 2002). Em machos, vários estudos evidenciaram o potencial contraceptivo de plantas. Por exemplo, o andrografolide, um dos principais constituintes de *Andrographis paniculata*, interfere com o processo reprodutivo de ratos, causando uma redução na contagem e motilidade de espermatozoides, além de um aumento no número de espermatozoides anormais (AKBARSHA; MURUGAIAN, 2000). O extrato etanólico de *Capparis aphylla* (Roth.) causa infertilidade em ratos, evidenciada pela diminuição na contagem e motilidade de espermatozoides, e alterações estruturais em células testiculares, sugerindo que esse extrato pode ser um contraceptivo masculino em potencial (REVATHI et al., 2010).

As autoridades reguladoras nacionais e internacionais têm se preocupado com a normatização dos medicamentos fitoterápicos, o que vem proporcionando a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. No Brasil, a responsabilidade pela regulamentação de produtos fitoterápicos é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão ligado ao Ministério da saúde, que estabelece normas e critérios relacionados ao uso destes medicamentos.

A Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996 da ANVISA propôs um roteiro para os estudos toxicológicos de fitoterápicos, e em 16 de março de 2004 foi publicado no diário oficial da União a resolução nº 90: Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, que contém os parâmetros mínimos para realização de toxicologia pré-clínica, além de testes complementares, como por exemplo a determinação de mutagenicidade e de efeitos adversos sobre a fertilidade e a performance reprodutiva causados por

drogas administradas durante a gametogênese e fecundação (BRASIL, 1996, 2004).

Em 2006, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, onde foi definida a inserção do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS). O objetivo dessa política visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo a utilização sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Existe uma preocupação governamental aliada a prospecção ética da biodiversidade, visando agregar ciência e tecnologia a seus produtos, ações de importância estratégica para os países em desenvolvimento, sendo um instrumento tanto para a descoberta de alternativas no tratamento de doenças, como para estimular o crescimento econômico (BRASIL, 2006). Dentro desse contexto, a realização de estudos toxicológicos e a implantação de políticas de fitofarmacovigilância tornam-se cada vez mais importantes para a definição do potencial tóxico de plantas medicinais e devem ser tomadas como prioridade para a saúde pública (MACIEL et al., 2002; BRASIL, 2006).

Pradosia Huberi Ducke é uma planta medicinal muito comum na floresta amazônica e usada pelas comunidades locais por suas atividades gastroprotetora e antiulcerogênica (KUSHIMA et al., 2005; MEDEIROS, 2008). Compostos bioativos, como flavonoides, esteroides, saponinas e triterpenos, foram encontrados no extrato hidroalcoólico da casca do caule dessa espécie, sendo alguns desses compostos conhecidos por apresentarem efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutor, como por exemplo, os flavonoides, que possuem atividade estrogênica, antiandrogênica e interferem na fertilidade (BHARGAVA, 1989; PETROVICK; ORTEGA; BASSANI, 1997; BAWA, 2010; SANTOS, 2011).

Levando em consideração o uso popular de *P. huberi*, a presença de compostos bioativos capazes de interferir na fertilidade e a inexistência de estudos de toxicidade reprodutiva em machos sobre essa planta aliado ao incentivo por parte do Ministério da Saúde no que diz respeito ao uso de fitoterápicos, esse trabalho teve como propósito investigar os possíveis efeitos tóxicos do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* sobre o sistema reprodutor, órgãos vitais e prole de ratos, com o intuito de contribuir para o aumento do

conhecimento científico relacionado à toxicidade dessa espécie vegetal e, dessa forma, fornecer informações seguras sobre seu uso.

Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre *Pradosia huberi* Ducke

Pradosia huberi (Ducke) Ducke (sinonímia *Glycoxylon huberi* Ducke) é uma espécie vegetal que pertence à família Sapotaceae, a qual compreende 53 gêneros e cerca de 1100 espécies, distribuídas principalmente nas regiões subtropicais e tropicais do mundo (CORRÊA, 1986; STEVENS, 2001). Ocorre preferencialmente em florestas úmidas, geralmente abaixo de 1.000 m, e seu principal centro de diversidade é a América tropical (APG II 2003; PENNINGTON, 2004). No Brasil, são registrados 14 gêneros e cerca de 200 espécies, principalmente na Floresta Amazônica, porém com menor ocorrência na Mata Atlântica, destacando-se a floresta do Espírito Santo e Sul da Bahia (SOUZA; LORENZI, 2005; PENNINGTON, 1990).

P. huberi é uma árvore com cerca de 30 - 40 m de altura, com sapopemas largas, casca branca acinzentada e adocicada e ocorre predominantemente em floresta permanente inundada, do Pará à Guiana Francesa. Suas folhas são espaçadas ou livremente agrupadas, opostas, glabras, com 10 - 15 pares de veias secundárias, estipes ausentes e fascículos grupados abaixo das folhas. As flores são de coloração branca, reunidas em número de 2 - 5, com sépalas de 0,2 cm de comprimento e pedúnculo 0,1 - 0,4 cm de comprimento. Os frutos apresentam-se ovóides ou elípticos, de 3 - 3,5 cm de comprimento, ápice e base arredondados e globosos (VAN ROOSMALEN et al., 2000) (Figura 1).

P. huberi é uma árvore nativa da floresta amazônica, conhecida popularmente como “casca-doce”, “pau-doce” ou “paracaua” e muito utilizada na medicina popular local para o tratamento de gastrite e úlcera gástrica (KUSHIMA et al., 2005; MEDEIROS, 2008).

Figura 1 – *Pradosia huberi* (Ducke) Ducke na reserva florestal do IEPA no município de Porto Grande – AP.

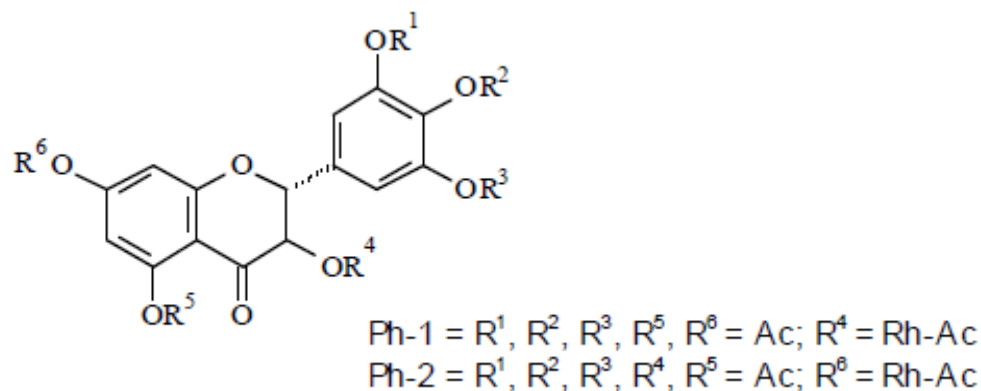


Fonte: MEDEIROS, 2008

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de inúmeros compostos bioativos no extrato etanólico da casca do caule de *P. huberi*, como: taninos, terpenoides, quinonas, alcaloides, flavanoides e saponinas. Os flavonoides foram identificados como sendo 2,3-dihidromiricetina 3-a-L-ramnosideo, astilbina, engelitina e 2,3-dihidromiricetina (JACQUEMIN et al., 1985, CORRÊA, 1986), que apresentam efeitos anti-inflamatório e antioxidante (KANBARA et al., 1994; HARAGUCHI, et al., 1996).

Dois derivados flavononóis glicosilados foram isolados das cascas do caule de *P. huberi* e identificados como sendo: 2,3-dihidromiricetina-3-O-raminosídeo acetato e 2,3-dihidromiricetina-7-O-raminosídeo acetato (Figura 2) (MEDEIROS et al., 2006).

Figura 2 – Estrutura de flavonoides isolados das cascas do caule de *Pradosia huberi*. Ph-1 (2,3-dihidromiricetina-3-O-raminosídeo acetato) e Ph-2 (2,3-dihidromiricetina-7-O-raminosídeo acetato).



Fonte: MEDEIROS et al., 2006

Os flavonoides constituem um grande grupo de compostos fenólicos de baixo peso molecular derivados de plantas, sendo consumidos em grandes quantidades na dieta diária. O consumo de flavonoides está inversamente associado com a morbidade e mortalidade provocada por doenças coronarianas (HERTOG et al., 1993; MULDON; KRITCHEVSKY, 1996). Isto se deve às suas propriedades farmacológicas que incluem a ação vasodilatadora, anti-inflamatória, antioxidante e inibidora da agregação plaquetária (SEIGNEUR et al., 1990; DUARTE et al., 1993; FITZPATRICK et al., 1993; HERRERA et al., 1996; DI CARLO et al., 1999). Entretanto, apesar das diversas propriedades farmacológicas atribuídas aos flavonoides, vários estudos relataram a ação tóxica desses compostos no organismo, causando, por exemplo, interferência no processo reprodutivo (BHARGAVA, 1989).

P. huberi é pouco relatada na literatura em relação aos seus aspectos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos, porém segundo Kushima e colaboradores (2005), o extrato hidroalcoólico da casca de *P. huberi* apresentou indícios de atividade antiulcerogênica contra lesões gástricas experimentalmente induzidas em camundongos. Estes pesquisadores também realizaram um teste de toxicidade oral aguda em camundongos e constataram que esse extrato não apresenta atividade tóxica até a dose de 5000 mg/kg (KUSHIMA et al., 2005). Outros estudos também revelaram que o extrato etanólico de *P. huberi*

apresentou potente atividade vasorelaxante e dose-dependente sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto (MEDEIROS, 2008). Um estudo de toxicidade aguda de dose única (2000 mg/kg), em ratos Wistar adultos, revelou efeito significativo sobre a diminuição do consumo de água e ração em machos tratados, refletindo sobre seu desenvolvimento ponderal. A análise hematológica e índices hematimétricos revelaram diminuições do hematócrito, hemoglobina, e plaquetas, sendo os machos mais sensíveis ao tratamento agudo (ROCHA, 2008).

2.2 Estudos de toxicidade reprodutiva

A toxicidade reprodutiva está relacionada à interferência de um agente tóxico sobre a performance reprodutiva de machos ou de fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal (NEUBERT; CHAHOUD, 1995). Alterações específicas podem ser causadas por fatores endógenos, como as anomalias congênitas, que ocorrem espontaneamente ou podem ser geradas pela interferência de substâncias tóxicas, como os efeitos teratogênicos (EPA, 1996; SACHETTI, 2010).

Os ensaios pré-clínicos de toxicidade reprodutiva avaliam o potencial de uma determinada substância em interferir sobre o sistema reprodutor e causar efeitos indesejáveis capazes de comprometer a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embrionário, o parto e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade sexual (EPA, 1996; LEMÔNICA, 2001).

Nos testes de avaliação da toxicidade reprodutiva, o rato é o modelo experimental de escolha, e convencionalmente utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus* e frequentemente a linhagem Wistar (COBEA, 1996, HOLLENBACH, 2008). Entretanto, como são exigidas duas espécies, sendo uma não roedora, normalmente os coelhos também são utilizados como modelo biológico para a avaliação dos efeitos de xenobióticos sobre a reprodução e fertilidade (NEUBERT; MERKER; KWASIGROCH, 1977).

Em relação às vias de administração utilizadas nos ensaios de toxicidade reprodutiva, a via oral é a mais utilizada, por permitir determinar a dosagem precisa da substância teste e a padronização dos níveis plasmáticos

maternos. Todavia, outras vias de administração podem ser utilizadas de acordo com as condições de exposição e características físico-químicas da substância em análise (LEMÔNICA, 2001).

A avaliação da toxicidade reprodutiva em machos, geralmente inclui o protocolo Segmento 1 do “Food and Drug Administration” (FDA) e o teste do letal dominante, além de testes de toxicidade aguda, subcrônica e crônica que fornecem dados relevantes, como a avaliação do peso de órgãos e dados histopatológicos que podem apontar os efeitos de substâncias no sistema reprodutor masculino (ZENICK et al., 1994; SÁ, 2003).

Os estudos de toxicidade reprodutiva podem ser divididos em três segmentos que são adaptados de normas da “Environmental Protection Agency” (EPA) e recomendadas pela “Food and Drug Administration” (FDA) e “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD), como segue:

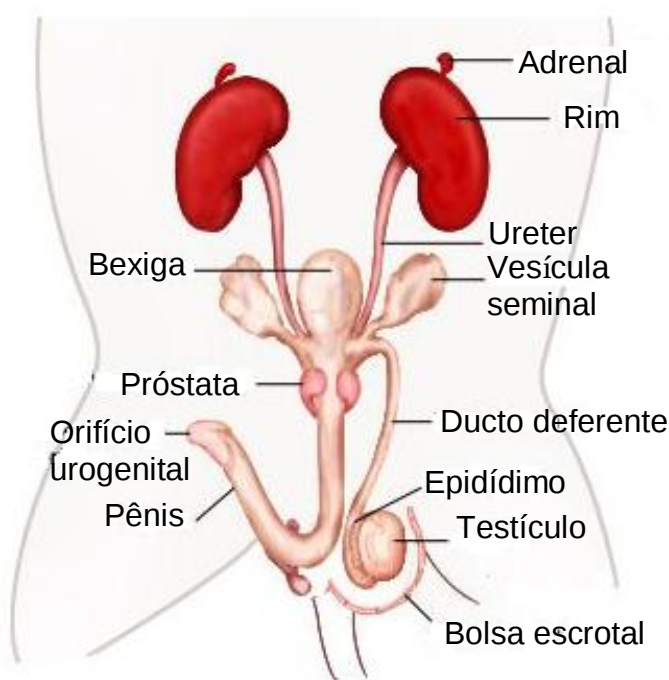
- a) segmento I – de toxicidade crônica, avalia os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas, sendo os machos tratados antes e durante o acasalamento e as fêmeas durante gestação e lactação;
- b) segmento II – de toxicidade pré-natal (teratogenicidade), avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese;
- c) segmento III – de toxicidade peri e pós-natal, avalia os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal da progênie exposta durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

A realização desses estudos é importante porque permite avaliar o efeito de uma substância no processo reprodutivo em diferentes fases de desenvolvimento, abrangendo desde o período neonatal, até a idade adulta e reprodutiva (HOLLENBACH, 2008).

2.3 Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino do rato, assim como na maioria dos mamíferos, é formado por glândulas e ductos, responsáveis pela produção, transporte e eliminação dos gametas masculinos (espermatozoides) e, pela produção e secreção de testosterona (BÚFALO, 2007). Esse sistema é formado pelas gônadas (testículos), epidídimos, canais deferente, ducto ejaculador, uretra, pênis e pelas glândulas acessórias, que incluem as vesículas seminais, a próstata e as glândulas uretrais (Figura 3) (ARENA, 2006).

Figura 3 - Desenho esquemático do sistema urogenital de rato.



Adaptado de <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/animalmorphology/respiratory-excretory-nervous-reproductive-system-rat.php>.

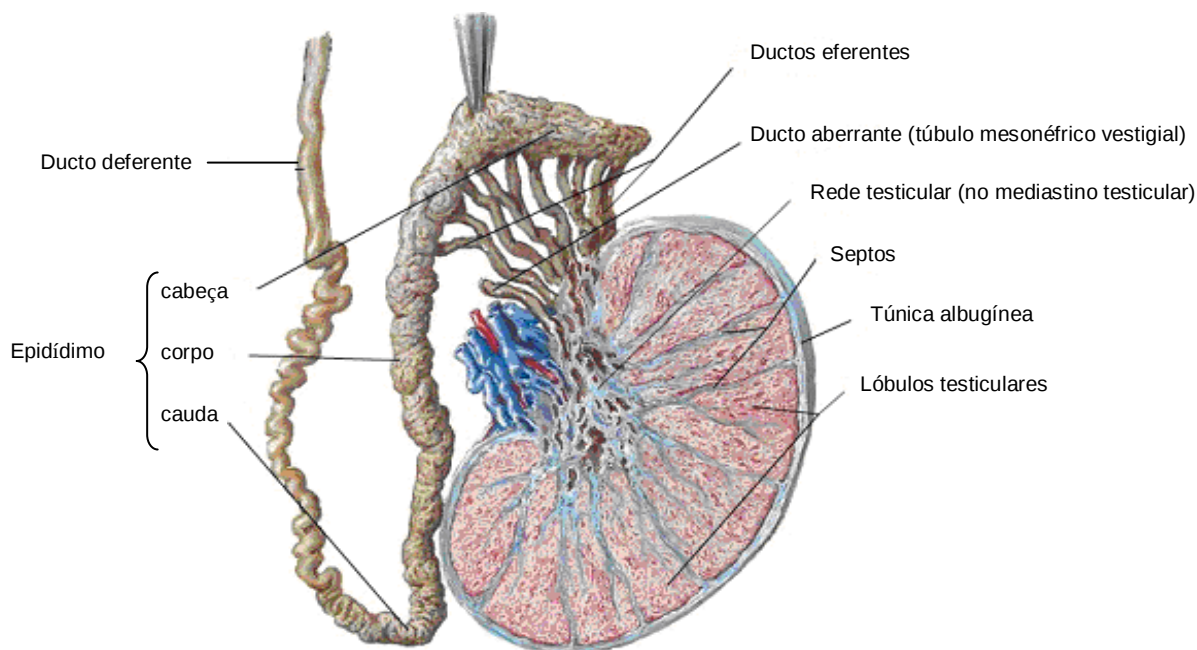
2.3.1 Testículos

Os testículos são as principais glândulas do sistema reprodutor masculino e podem ser divididos, funcional e anatomicamente em duas partes: tecido intersticial (células de Leydig) e túbulos seminíferos (células de Sertoli) (FERNANDEZ, 2006). As células de Sertoli são responsáveis pela produção de espermatozoides (espermatogênese) e as células de Leydig, pela produção de testosterona (esteroidogênese) (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999). A testosterona é um hormônio sexual masculino que desempenha um papel importante na determinação dos caracteres sexuais secundários e no desenvolvimento do sistema reprodutor no adulto (DADOUNE; DEMOULIN, 1993; RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999).

As gônadas masculinas apresentam-se na forma ovoide e se localizam abaixo do pênis, na parte anterior do períneo e dentro das bolsas escrotais, onde ficam suspensas por meio dos funículos espermáticos. Medem entre 40 - 45 mm de largura e 80 mm de altura, apresentando uma consistência elástica, mole e flácida (SILVA; DODE, 1993; MOORE, 1999; OLIVEIRA, 2010).

Os testículos são órgãos pares e encontram-se envolvidos por uma capsula fibrosa de tecido conjuntivo denso, denominada tunica albugínea, que contém vasos sanguíneos. O tecido conjuntivo da túnica albugínea é contíguo ao tecido conjuntivo laxo que forma septos, dividindo o parênquima testicular em lóbulos. Nos lóbulos dos testículos encontram-se os túbulos seminíferos que são canais produtores de espermatozoides. Os túbulos seminíferos convergem para o mediastino dos testículos, onde formam a rede testicular (rete testis), que junto com os vasos eferentes constituem os ductos excretórios de espermatozoides (Figura 4) (BANZATO, 2010).

Os canais eferentes transportam os espermatozoides recém-formados da rede do testículo para o epidídimo, onde são armazenados por períodos curtos até que amadureçam. A cauda do epidídimo é contínua com o canal deferente, o qual transporta os espermatozoides do epidídimo para o canal ejaculatório para expulsão na região prostática da uretra (MOORE, 1999; ESPERANÇA PINA, 2004; OLIVEIRA, 2010).

Figura 4 - Esquema representativo da organização testicular numa secção frontal.

Adaptado de http://www.becomehealthynow.com/popups/male_testes.htm.

2.3.2 Epidídimo e ducto deferente

O epidídimo é um órgão formado por um ducto único, longo e bastante contorcido que faz a conexão entre os ductos eferentes e o ducto deferente (HERMO; ROBAIRE, 2002; SULLIVAN et al., 2005). Nos mamíferos, os epidídimos são divididos anatomicamente em três regiões principais: cabeça, corpo e cauda, que possuem características histológicas distintas e, portanto funções fisiológicas diferentes. A cabeça do epidídimo é o segmento inicial e o local no qual os espermatozoides são rapidamente transportados, já o corpo é a região onde a maior parte do fluido no lúmen é absorvido e onde ocorre a maturação do espermatozóide, e a cauda do epidídimo é o local onde os espermatozoides são armazenados (GLOVER, 1982; REID; CLELAND, 1957; HERMO; ROBAIRE, 2002, ARENA, 2006). Estas porções são subdivididas histologicamente em zonas que são designadas de acordo com a altura do epitélio e a distribuição e quantidade dos tipos celulares. O epidídimo apresenta epitélio pseudoestratificado ciliado, o qual possui diferentes tipos de células:

basais, principais, estreitas, halos, claras e apicais (HERMO; ROBAIRE, 2002). O epitélio epididimário encontra-se envolvido por uma camada de músculo liso, apresentando-se mais fina na região da cabeça e corpo e mais espessa na cauda. Essa camada muscular recebe a inervação de fibras adrenérgicas do sistema nervoso simpático (SETCHELL, 2002).

Nos ratos, após os espermatozoides atingirem a parte proximal da cauda do epidídimo, eles adquirem o potencial para a motilidade progressiva, garantindo a sobrevivência e o sucesso na fertilização (ZENICK et al., 1994). Além disso, alterações que ocorrem durante o trajeto através do epidídimo têm uma importante função no processo de maturação espermática (capacidade para motilidade, reconhecimento e fertilização do ovócito) (JONES, 1999; GATTI et al., 2004; ROBAIRE et al., 2006). Há evidências de que este processo de maturação ocorra pela ação de componentes químicos do epidídimo, como ácido siálico, carnitina, proteínas e glicerilfosforilcolina, produzidos e secretados sob o controle de andrógenos (ORGBIN-CRIST; JAHAD, 1978; RAJALAKSHMI, 1984). Dessa forma, a ocorrência de mudanças no trânsito através do epidídimo pode alterar os parâmetros seminais como a quantidade, a morfologia e a motilidade dos gametas, e comprometer a fertilidade em machos (SHARMA et al., 1996; FERNANDEZ et al., 2007).

O ducto deferente é um canal muscular que emerge na margem epididimária do testículo, como continuação da cauda do epidídimo e termina na porção prostática da uretra. No rato, esse ducto mede de 5 a 6 cm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro e pode ser dividido em três partes, de acordo com características histológicas e tamanho do lúmen. O segmento proximal localiza-se na bolsa escrotal, o segmento distal encontra-se situado na região inguinal e o segmento terminal localiza-se na pélvis abdominal e termina na região onde se encontra com o ducto da vesícula seminal (HEBEL; STROMBERG, 1986; HAMILTON; COOPER, 1978). O ducto deferente possui uma mucosa pregueada e revestida por epitélio pseudo-estratificado prismático com estereocílios; uma lâmina própria de tecido conjuntivo, com muitas fibras elásticas; uma camada muscular, formada por uma camada média circular e duas camadas longitudinais (interna e externa); e uma camada adventícia de tecido conjuntivo (ROSS; ROMRELL, 1993).

2.3.2 Vesículas seminais

As vesículas seminais são duas glândulas volumosas, lobadas e de formato irregular. No rato, essas glândulas são achatadas dorsoventralmente, com pólo proximal direcionado caudalmente, apresentando um epitélio pseudo-estratificado pregueado, constituído por células epiteliais secretoras e células basais (HAYWARD et al., 1996). As células basais estão dispostas inferiormente às células principais, e apresentam núcleos poligonais e centrais com superfícies separadas da luz pelo ápice das células principais, já as células principais, são colunares com núcleos basais, sendo maiores e mais numerosas que as células basais. A vesícula seminal apresenta-se envolvida por três camadas, sendo uma interna, de natureza mucosa e que forma um conjunto de dobras, com epitélio secretor apoiado sobre lâmina própria, composta de feixes de fibras colágenas entrelaçadas; uma camada intermediária muscular que reveste o órgão e é constituída por duas lâminas: uma interna, de fibras circulares, e outra de fibras longitudinais; e uma camada serosa externa, delgada e composta de tecido conjuntivo frouxo. Cada glândula apresenta ducto único que desemboca na uretra (GUDE et al., 1982; HEBEL; STROMBERG, 1986; MARTINEZ et al., 1992; MARTINEZ et al., 1995). O lado ventromedial da vesícula seminal apresenta-se côncavo e aderido à glândula de coagulação. A luz é ocupada pelo produto de secreção, de aspecto hialino (HAYWARD et al., 1996).

2.3.3 Próstata

É um órgão acessório do sistema genital masculino que contribui com uma fração importante do líquido seminal e com a capacitação e sobrevivência dos espermatozoides (ISAACS, 1984). A próstata é composta de glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática e localiza-se em posição caudal à bexiga (ROY-BURMAN et al., 2004). Apresenta epitélio colunar simples, formado por células secretoras, basais e neuroendócrinas e encontra-se envolta por uma cápsula fibroelástica, rica em músculo liso, que envia septos para o interior da glândula. No homem, este órgão é compacto (alobular) e dividido anatomicamente em quatro regiões glandulares:

zona periférica, zona central, zona de transição e tecido glandular periuretral, além de uma quinta região não glandular, o estroma fibromuscular (COAKLEY; HRICAK, 2000). No rato, a próstata é dividida em quatro pares de lóbulos de acordo com a posição: próstata anterior, dorsal, ventral e lateral (LEE et al., 1990; MARKER et al., 2003; ROY-BURMAN et al., 2004).

Os produtos de secreção da vesícula seminal e próstata contribuem para a nutrição e suporte dos espermatozoides fora do trato genital masculino. As funções desta glândula são dependentes de estímulo androgênico como a testosterona, que atua diretamente nos órgãos sexuais acessórios masculinos (MANN, 1974).

2.3.4 Pênis

O pênis é o órgão copulador masculino, anatomicamente é composto por raiz, corpo e glande, que é uma dilatação na porção terminal desse órgão. O pênis é formado por tecido erétil, mais a uretra e encontram-se envoltos externamente por pele (MENEZES, et al., 2003).

O corpo do pênis do rato é formado pela união de dois corpos cavernosos penianos e um corpo cavernoso uretral, que se designa como dois ramos do pênis, um corpo esponjoso e a uretra. Estes ramos se fundem para formar o corpo cavernoso do pênis. Os três corpos cavernosos encontram-se envoltos por uma resistente membrana de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea do pênis, a qual forma um septo que penetra entre os dois corpos cavernosos do pênis (HEBEL; STROMBERG, 1986).

O prepúcio é a prega retrátil da pele do pênis, contendo tecido conjuntivo e músculo liso no seu interior. Observam-se, na sua dobra interna e na pele que recobre a glande, pequenas glândulas sebáceas (glândulas prepuciais). No rato, estas glândulas possuem um denso parênquima e um sistema ramificado de ductos e produzem uma secreção de natureza não lipídica (SETCHELL; MADDOCKS; BROOKS, 1994). Um osso peniano está presente no pênis dos roedores e localiza-se centralmente à glande. Este osso inicia-se na transição do corpo para a glande, como uma continuação do corpo cavernoso do pênis (VILMAM; VILMANN, 1979; HEBEL; STROMBERG, 1986).

2.4 Espermatogênese

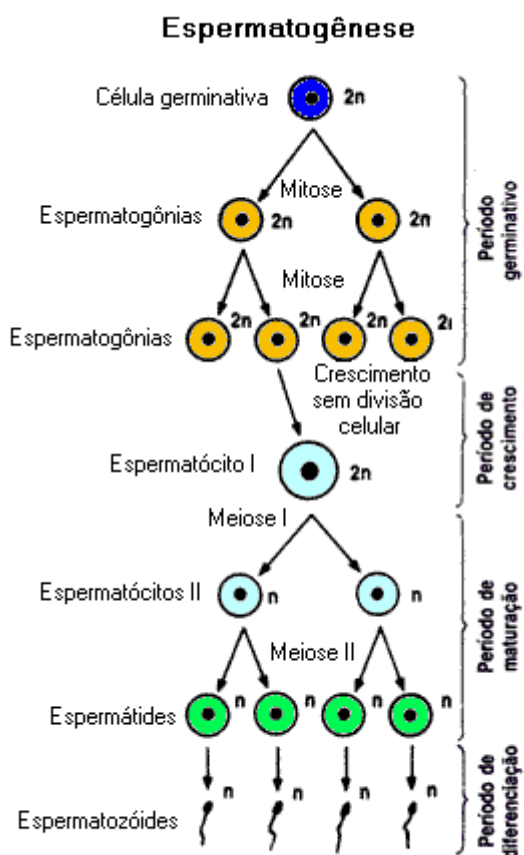
A espermatogênese é um processo onde ocorrem divisões e diferenciação de células germinativas, para promover a formação de espermatozoides (McDONALD; PINEDA, 1989; O'DONNEL et al., 2001). Em ratos, esse fenômeno ocorre entre o 50º e o 60º dias de vida (TOMÉ, 2002).

Esse processo se divide em duas etapas: a espermatocitogênese e espermiogênese. Na primeira etapa, as espermatogônias sofrem divisões mitóticas e meióticas para dar origem às espermátides (McDONALD; PINEDA, 1989). As espermatogônias são células germinativas indiferenciadas, presentes na membrana basal dos túbulos seminíferos que após sofrerem diferenciação são classificadas em subtipos de acordo com o estado de diferenciação, incluindo a espermatogônia tipo A, intermediária (encontrada apenas em roedores) e tipo B (O'DONNEL et al., 2001; HULEIHEL; LUNENFELD, 2004).

As espermatogônias sofrem mitoses sucessivas e dão origem a uma população de células-tronco ou a células que continuam o processo de mitose. Estas células passam então a ser chamadas de espermatócitos primários (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

Após a última mitose, quando a espermatogônia do tipo B é formada, esta dá origem a espermatócitos no estágio pré-leptoteno primário, que replicam o seu DNA, caracterizando o início da fase meiótica (HESS, 1999; O'DONNEL et al., 2001).

Os espermatócitos primários entram na primeira divisão meiótica, dando origem a células menores, os espermatócitos secundários. Estas células entram rapidamente na segunda divisão meiótica para gerar a espermátide, que são células haploides arredondadas (Figura 5) (ROSS; ROMRELL, 1993; O'DONNEL et al., 2001).

Figura 5 – Esquema da espermatogênese humana.

Adaptado de <http://www.rincon.com.br/Imagens/gg> Espermatogenese.gif.

2.4.1 Espermio gênese

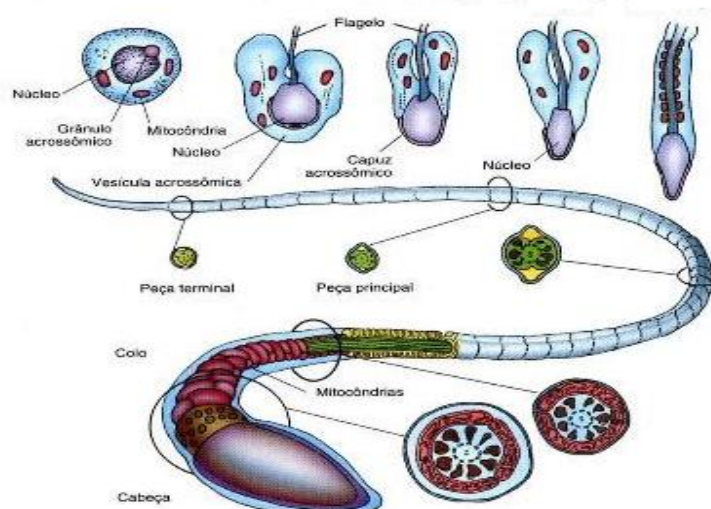
A espermio gênese é uma fase de diferenciação celular, onde ocorre a transformação de espermátides em espermatozoides, células adequadamente capacitadas para alcançar e fertilizar o gameta feminino (Figura 6) (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004). Ela tem início nos túbulos seminíferos e termina no epidídimo (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

Nesta fase, as espermátides sofrem acentuada metamorfose e se diferenciam da forma celular esférica para células que contêm uma cabeça aerodinâmica com enzimas penetrativas, com um núcleo condensado que carrega

o genoma masculino, e uma cauda responsável pela motilidade celular (JOHNSON, 1991). A fase em que ocorrem as maiores transformações morfológicas (condensação, alongamento da forma) do núcleo e da membrana é a fase acrossômica, a qual é seguida da maturação do espermatozoide, em que se finaliza a forma da cabeça e condensação da cromatina, a formação da cauda e do pescoço, originando o espermatozoide (BARTH; OKO, 1989).

Os espermatozoides dos mamíferos são células altamente especializadas, porém quando saem do testículo, eles ainda são imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito (BROOKS, 1983; HERMO; ROBAIRE, 2002; GATTI et al., 2004). É durante o trajeto pelo epididímo que os espermatozoides passam por mudanças morfológicas, fisiológicas e biológicas, conferindo maturação a esses gametas, e, portanto a capacidade de motilidade e a habilidade para sofrer a reação acrossômica, interagir com a zona pelúcida, reconhecer e fundir-se com a membrana plasmática do ovócito (ORGEBIN-CRIST, 1969, JONES, 1999; CUASNICÚ et al., 2002; GATTI et al., 2004, SULLIVAN et al., 2005).

Figura 6 – Esquema ilustrativo da espermiogênese e do espermatozoide de mamífero.



Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAe3UIAI/slides-espermatogenese>.

2.4.2 Controle hormonal da espermatogênese

A espermatogênese é regulada por mecanismos endócrinos que envolvem o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999).

O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual é responsável por iniciar grande parte do controle das funções sexuais masculinas. O GnRH estimula a hipófise anterior a secretar o LH e o FSH (Figura 7) (SALADIM, 2001).

No macho, o LH é o hormônio estimulador das células intersticiais (Leydig), secretoras de testosterona, necessária para o desenvolvimento normal das células da linhagem germinativa, enquanto o FSH estimula a espermatogênese pela sua ação nas células de Sertoli, estimulando a adenil ciclase e aumentando a presença de AMP cíclico, promovendo a síntese e secreção de proteína de ligação ao andrógeno (ABP), que se liga à testosterona, possibilitando o transporte deste hormônio para o lúmen dos túbulos seminíferos no testículo (MARTY et al., 2003; MEANS, 1976; BANZATO, 2010; ZIRKIN, 1998).

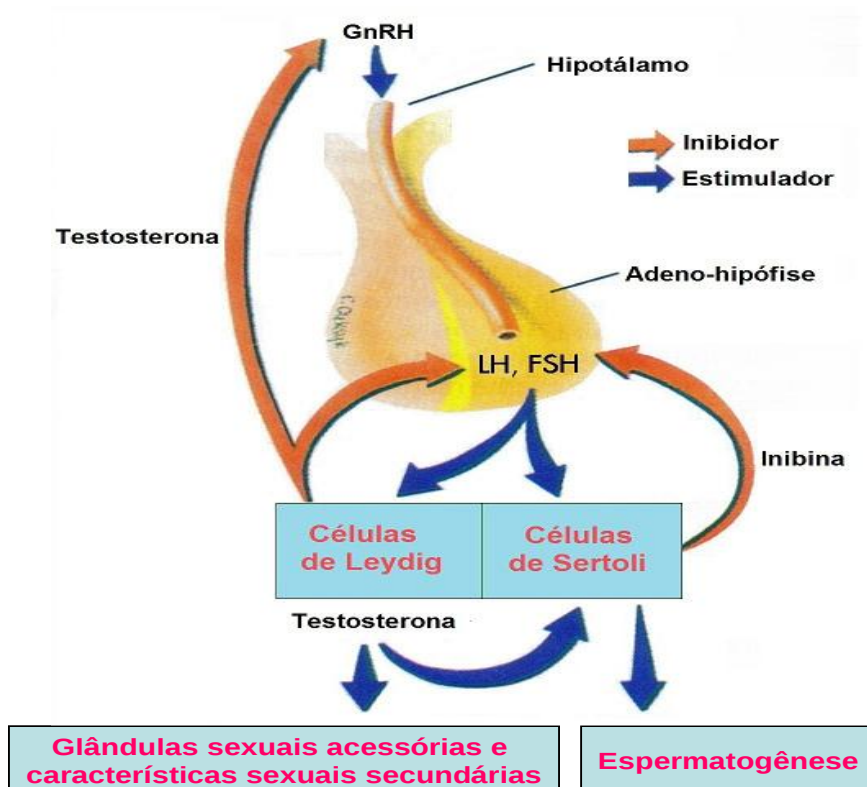
A concentração da testosterona testicular é um fator determinante para a manutenção da produção espermática, e este hormônio está envolvido na regulação do desenvolvimento testicular e na formação das características sexuais secundárias (WRIGHT; FRANKEL, 1979; AWONIYI, et al., 1989; McLACHLAN, et al., 1994).

A espermatogênese é regulada pela testosterona e pela inibina, através de mecanismos de “feedback” no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Figura 7). A secreção de LH e FSH pela hipófise é modulada pela testosterona, e a inibição da secreção do LH E FSH resulta, provavelmente, do efeito direto da testosterona sobre o hipotálamo, que diminui a secreção de GnRH. A diminuição de produção de LH pela hipófise anterior reduz a produção de testosterona pelos testículos. Dessa forma, quando há um aumento acentuado nos níveis séricos de testosterona, este efeito de “feedback” negativo automático irá reduzir a secreção de testosterona para o nível desejado. Por outro lado, quando os níveis séricos de testosterona são insuficientes, o hipotálamo secreta uma grande quantidade de

GnRH, proporcionando o aumento da produção de LH e FSH pela hipófise anterior, e aumentando assim os níveis de testosterona (SALADIM, 2001; ROSS; ROMRELL, 1993). A inibina, hormônio produzido nos machos pelas células de Sertoli, também participam desta regulação, propiciando uma retro-alimentação negativa da secreção de FSH (STANBEFELD; EDQVIST, 1996; NETT, 1993)

O funcionamento do sistema reprodutor masculino pode ser afetado por um agente tóxico, durante sua passagem pela barreira hemato-testicular ou pela ação direta sobre as células de Leydig e levar à inibição da divisão ou diferenciação celular, inibição do metabolismo intermediário ou ainda à interferência na produção de andrógenos, podendo comprometer a espermatogênese, a fertilização e a síntese de hormônios (ZENICK et al., 1994; DALLEGRAVE, 2003).

Figura 7 - Desenho esquemático da regulação hormonal do sistema reprodutor de mamífero, mostrando as vias de estimulação (azul) e inibição (laranja) da função reprodutiva.



Adaptado de OLIVEIRA, 2010.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial tóxico de *Pradosia huberi* sobre o sistema reprodutor masculino, órgãos vitais e prole de ratos Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), usando técnicas *in vivo*.

3.2 Específicos

- a) Determinar a toxicidade crônica de *P. huberi* em ratos;
- b) Investigar a ocorrência de toxicidade nos testículos e epidídimo e avaliar o efeito tóxico no funcionamento desses órgãos e no processo espermatogênico;
- c) Investigar a ocorrência de toxicidade na vesícula seminal e próstata ventral, e avaliar o efeito tóxico no funcionamento dessas glândulas;
- d) Investigar a ocorrência de toxicidade em órgãos vitais de ratos;
- e) Avaliar os efeitos de *P.huberi* sobre o perfil bioquímico e hematológico de ratos;
- f) Investigar o efeito da administração de *P.huberi* no acasalamento de ratos;
- g) Acompanhar a gestação e a prole de ratas não tratadas e acasaladas com os ratos tratados;
- h) Avaliar o desenvolvimento geral, reflexológico e comportamental da prole.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material vegetal

A casca do caule de *P. huberi* foi coletada na área de reserva do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), localizada no município de Porto Grande - Amapá, onde uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) sob nº 12519, no Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá (IEPA).

4.1.2 Animais

Em cada protocolo experimental foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), adultos (90 dias de idade), de ambos os sexos, pesando entre 250 a 300 g (machos) e entre 150 a 250 g (fêmeas virgens), provenientes do biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (ração do tipo *pellets* da marca Purina®) e água potável. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Todas as precauções foram tomadas no sentido de diminuir a dor e o sofrimento dos animais, seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/UFPB), certidão número **0409/10**.

4.1.3 Substâncias

- ✓ Cloridrato de cetamina;
- ✓ Cloridrato de xilazina;
- ✓ Kits para análises bioquímicas (glicose, ureia, creatinina, transaminases, colesterol, triglicerídios, ácido úrico, amilase e albumina);
- ✓ Tubos com gel separador para análises bioquímicas;
- ✓ Tubos à vácuo com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) para análises hematológicas;

4.1.4 Aparelhagem

- ✓ Analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus® – Roche Diagnostic System – Estados Unidos, utilizado para as determinações bioquímicas no soro.
- ✓ Analisador hematológico celular automático – Animal Blood Counter – ABC Vet®, França, para realização do hemograma e contagem de plaquetas.
- ✓ Sistema automático (HEMATEL 200®) para corar células sanguíneas.
- ✓ Balança analítica marca AID – HR – 120g – Japão.
- ✓ Balança eletrônica BG – GEHAKA.
- ✓ Centrífuga BIO ENG® BE 4000, para separação do soro em dez minutos, a 3500 rpm.
- ✓ Microscópio Olympus®, Brasil, para confirmação e controle da contagem diferencial de células sanguíneas.
- ✓ Microscópio RML5® Askmania-Germany, utilizado nas análises histopatológicas.
- ✓ Campo aberto: fabricado na UFPB, semelhante ao descrito por Broadhurst (1960), com adaptações de Moraes e colaboradores (1998), para avaliação da capacidade exploratória dos animais.

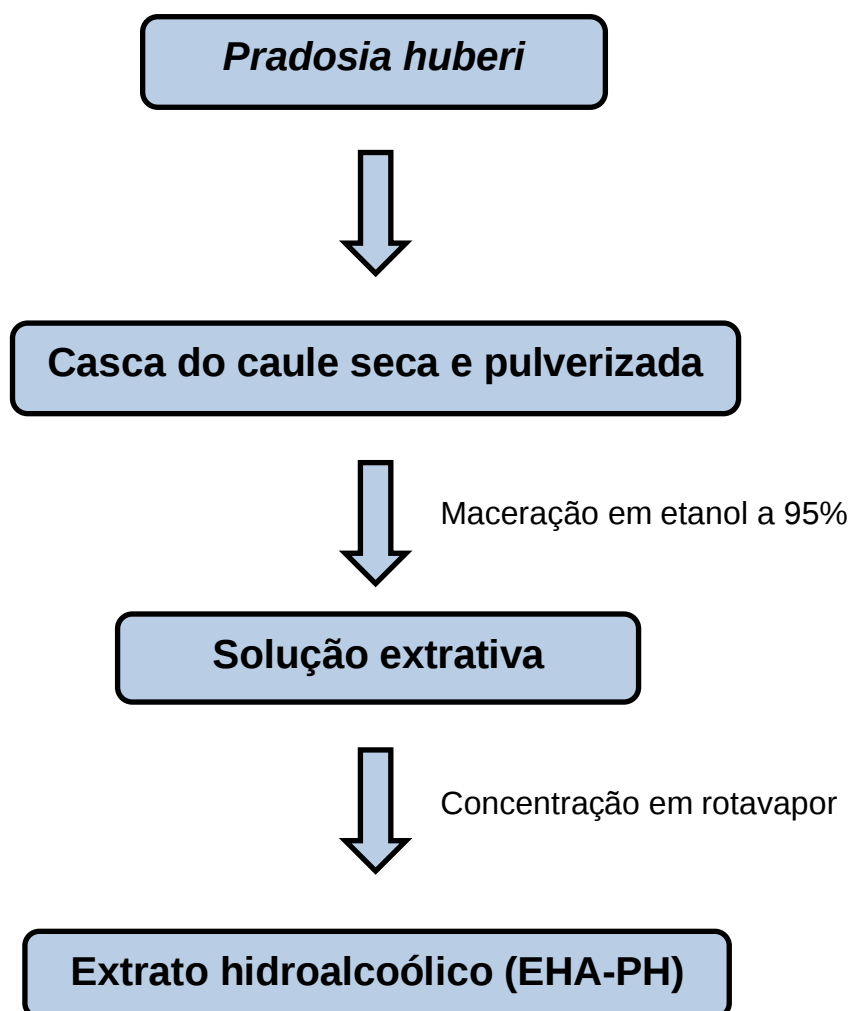
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *Pradosia huberi* e das soluções

O extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *P. huberi* (EHA-PH) foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Alessandra Azevedo Nascimento de Medeiros do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá. As cascas foram secas em estufas de ar circulante a 45 °C e trituradas em moinho mecânico para preparação do extrato. As cascas do caule de *P. huberi* secas e pulverizadas (3,3 kg) foram maceradas com etanol a 95 % a temperatura ambiente durante dez dias. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo a 45 °C, obtendo-se 480 g de extrato etanólico bruto de *P. huberi* (Figura 8).

O EHA-PH foi diluído em água destilada, para obtenção das soluções em concentrações adequadas à administração correta das doses, de acordo com os protocolos experimentais.

Figura 8 - Esquema do processo de preparação do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi*.



4.2.2 Determinação das doses e distribuição dos grupos

A portaria de nº 116 da ANVISA e a resolução RE 90/2004, contendo o Guia para a realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos recomenda que, para estudo de toxicidade de doses repetidas de um fitoterápico, deverão ser calculadas três doses, espaçadas geometricamente. A dose máxima não deve ser superior a 2 g/kg de peso corporal e a via de administração deverá coincidir com o uso popular.

As doses utilizadas neste trabalho foram determinadas por cálculo de progressão geométrica e com base em estudos prévios que avaliaram a atividade antiulcerogênica de *P. huberi* em ratos e camundongos (KUSHIMA et al., 2005) e sua toxicidade aguda e crônica em ratos Wistar (ROCHA, 2008).

4.2.2.1 Doses e grupos

Durante os experimentos, o EHA-PH foi administrado por gavagem a ratos Wistar e para cada protocolo experimental foram formados quatro grupos de 15 animais cada, sendo três tratados com o EHA-PH (T1, T2 e T3), e um grupo controle (C) que recebeu água destilada. Os animais foram tratados, de acordo com o seguinte protocolo:

Grupo C: animais tratados com água destilada, sendo o volume equivalente a 10 mL/kg de massa corporal;

Grupo T1: animais tratados com a dose diária de 1,22 mg/kg de peso corporal, equivalente à dose usual recomendada para seres humanos;

Grupo T2: animais tratados com a dose diária de 6,1 mg/kg de peso corporal, equivalente a 5 vezes à dose usual recomendada para seres humanos;

Grupo T3: animais tratados com dose diária de 30,5 mg/kg de peso corporal, equivalente a 25 vezes à dose usual recomendada para seres humanos.

4.2.3 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratos Wistar expostos ao extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi*

Os experimentos foram realizados a partir de adaptações de protocolos experimentais, e segundo as recomendações sugeridas pelos órgãos internacionais, como a “Food and Drug Administration” (FDA, 2001), “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD, 1995) e “Environmental Protection Agency” (EPA, 1996), que detectam efeitos reprodutivos e de desenvolvimento, mediados por alterações nas vias estrogênica, androgênica e tireoideana. Assim como pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através de sua portaria de nº 116/MS/SNSV/1996, que recomenda a determinação de efeitos adversos sobre a fertilidade e capacidade reprodutiva (Brasil, 1996).

Para a avaliação da toxicidade reprodutiva, ratos adultos divididos em quatro grupos (n = 15) foram tratados com o EHA-PH (T1, T2 e T3) e com água destilada (C).

Os animais foram tratados por 63 dias consecutivos, período que reflete a duração do ciclo espermatogênico em ratos Wistar mais o tempo de trânsito dos espermatozoides através do epidídimo (SOMKUTI et al., 1987). Na última semana de tratamento (57º - 63º), os ratos foram acasalados com fêmeas virgens não tratadas (n = 30/grupo) e no 64º dia, os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g (8,75mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL) e eutanasiados por deslocamento cervical (FLECKNELL, 1996; KOHN, et al., 1997). Os parâmetros avaliados estão enumerados nos subitens seguintes.

4.2.3.1 Acasalamento, diagnóstico de prenhez e verificação da fertilidade dos machos

Para a verificação da ocorrência de acasalamento e análise da fertilidade dos machos, ratos Wistar adultos controle e tratados com o EHA-PH, durante 63 dias consecutivos, foram acasalados com fêmeas virgens em estro na última semana de tratamento (57º - 63º dia). O estro é o período de maior receptividade sexual observado na maioria das fêmeas, durante o qual ocorre a ovulação, com máxima probabilidade de fecundação (ZENICK; CLEGG, 1994; AIRES, 1999).

O sistema de acasalamento foi do tipo poligâmico, onde durante o ciclo escuro, cada macho foi acasalado com duas fêmeas virgens em estro, permanecendo durante toda a noite (CASTRO, 2005). Na manhã seguinte ao acasalamento, os animais foram separados e reconduzidos às suas gaiolas de origem e foram realizados esfregaços vaginais para a verificação da presença de espermatozoides. O esfregaço foi realizado com auxílio de uma micropipeta, através da lavagem vaginal com 50 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% e posterior avaliação, a fresco, em microscopia ótica (CANTARUTTI, 2005; MÜLLER, 2007). A presença de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerada indicativo de inseminação, ficando assim estabelecido como sendo o dia zero de gestação (GLEICH; FROHBERG, 1977; KATO; MORISHIGE; ROTCHILD, 1979, DALLEGRAVE, 2003; SÁ, 2003). As ratas prenhas foram mantidas isoladas, para acompanhamento de suas gestações (ALMEIDA; MELO; XAVIER, 2000; SÁ, 2003; MELLO et al., 2004).

4.2.3.2 Parâmetros avaliados nos ratos

Durante o período de pré-acasalamento foram avaliadas e registradas as seguintes variáveis:

✓ **Sinais gerais de toxicidade**

Os animais foram observados, diariamente, para a verificação da ocorrência de piloereção, alteração da atividade locomotora, resposta ao toque aumentada/diminuída; constipação, diarreia, queda de pelos e mortes.

✓ **Ganho de massa corporal (g)**

Para a avaliação do ganho de massa corporal, o peso corporal dos animais foi registrado no primeiro dia das administrações do EHA-PH, uma vez por semana e no dia da eutanásia.

✓ **Consumo diário de água (mL) e ração (g)**

Os animais tiveram acesso a mamadeiras com água e o seu consumo foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento, com a realização de registros diários do volume de água ingerido pelo animal. O alimento fornecido era do tipo pellets e o seu consumo, diário, foi registrado pela diferença entre uma quantidade pré-estabelecida de ração colocada em um dia e o que restava no dia seguinte.

Após o período de acasalamento, os seguintes parâmetros foram avaliados:

✓ **Parâmetros sanguíneos: hematológicos e bioquímicos**

Após os 63 dias de experimentação, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas. No 64º dia, foram previamente anestesiados para a realização da sangria do plexo braquial. O sangue coletado foi então preparado para processamento hematológico e bioquímico. No primeiro processamento, o sangue foi colocado em tubos devidamente identificados, contendo anti-coagulante (EDTA), enquanto no segundo, o sangue foi posto em tubos, contendo gel separador (Microtiner Becton Dickson), centrifugados para obtenção de amostras de soro, e realização das determinações bioquímicas.

a. Hematológicos

A análise hematológica consistiu no estudo da série vermelha (eritograma), que envolveu a contagem de hemácias, a determinação da massa sanguínea (hematócrito), hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). Já para a análise da série branca (leucograma), foi realizada a contagem geral de leucócitos, assim como a contagem da diferenciação celular e de plaquetas. Estas determinações foram feitas pelo analisador hematológico celular automático “Animal Blood Counter Vet®”, para obtenção do hemograma e contagem de plaquetas. Os esfregaços sanguíneos foram corados automaticamente no HEMATEL® 200 e analisados em microscópio óptico, para confirmação e controle da contagem das células.

b. Bioquímicos

Com a obtenção das amostras de soro, foram avaliados os parâmetros bioquímicos, utilizando-se os seguintes métodos :

- Enzimático – glicose, ureia, ácido úrico, colesterol total, creatinina e triglicerídeos;
- Cinético – aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT)
- Biureto – albumina.

✓ Análise macróscópica dos órgãos

Após eutanásia, os animais sofreram laparotomia para remoção e pesagem dos seguintes órgãos: coração, cérebro, pulmões, fígado, rins, hipófise, próstata, epidídimo direito, vesículas seminais e testículos. Estes órgãos foram destituídos de gorduras adjacentes e tiveram suas massas absolutas aferidas em balança analítica seguido da determinação de seus pesos relativos (peso do órgão por 100 g de peso corpóreo). Os órgãos foram analisados macroscopicamente, para a avaliação de alterações quanto ao aspecto, tamanho, cor e forma.

✓ Índice de fertilidade

Os espermatozoides foram coletados na secreção epididimária da cauda do epidídimo esquerdo dos ratos. Uma gota dessa secreção foi colocada em 0,5 ml de soro fisiológico e, posteriormente, diluída em 20 mL de água destilada, de onde se obteve uma alíquota para se proceder a contagem dos espermatozoides, e análise dos tipos de anomalias existentes, em câmara de Neubauer. O número total de espermatozoides foi obtido pela média de duas contagens, correspondentes ao campo superior e inferior da câmara de Neubauer (MORAES, 1994; SÁ, 2003).

4.2.3.3 Parâmetros avaliados nas ratas não tratadas

✓ Índices de fertilidade e de reprodução

Ratas não tratadas foram acasaladas com os ratos tratados (T1, T2 e T3) e controle (C1) (n = 30 fêmeas por grupo), e a partir da constatação do acasalamento (presença de espermatozoides no esfregaço vaginal ou detecção de tampão vaginal), foram divididas em dois grupos de 15 animais, onde no grupo 1, as fêmeas tiveram a gravidez interrompida no 15º dia de gestação, sendo anestesiadas com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g, eutanasiadas por deslocamento cervical e examinadas para análise das seguintes variáveis (ZENICK; CLEGG, 1994; ALMEIDA; MELO; XAVIER, 2000):

- ✓ Número total de embriões implantados;
- ✓ Número de reabsorções;
- ✓ Número de corpos lúteos;
- ✓ Índice de acasalamento [(fêmeas inseminadas/fêmeas acasaladas) x 100];
- ✓ Índice de gestação [(fêmeas com implantes/fêmeas inseminadas) x 100];
- ✓ Índice de perda pré-implantação [(corpos lúteos - implantações/corpos lúteos) x 100];
- ✓ Índice de implantação [(implantações totais/corpos lúteos) x 100];
- ✓ Ocorrência de malformações externas.

No grupo 2, as 15 ratas restantes de cada grupo foram acompanhadas durante o período gestacional (21 dias) e após eutanásia, as seguintes variáveis foram avaliadas:

- ✓ Número total de nascimentos;
- ✓ Número de machos e fêmeas nascidos;
- ✓ Número total de animais desmamados;
- ✓ Número de machos e fêmeas desmamados;
- ✓ Índice de nascimento (%) = (nº de filhotes nascidos vivos / nº de filhotes nascidos) x 100;

- ✓ Índice de viabilidade (%) = $(\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos no 4}^\circ \text{ dia pós natal} / \text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}) \times 100$;
- ✓ Índice de desmame (%) = $(\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos no desmame} / \text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}) \times 100$;
- ✓ Razão sexo = $\text{n}^\circ \text{ de filhotes machos} / \text{n}^\circ \text{ de filhotes fêmeas}$;
- ✓ Índice de perda pós-implantação = $(\text{n}^\circ \text{ de implantes} - \text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos} / \text{n}^\circ \text{ de implantes}) \times 100$;
- ✓ Ocorrência de malformações externas.

3.2.3.4 Parâmetros avaliados na progênie

Os animais provenientes do acasalamento de ratos machos tratados com fêmeas não tratadas foram avaliados durante a lactação (21 dias pós natal) quanto ao seu desenvolvimento geral, desenvolvimento reflexológico e avaliação comportamental (MÜLLER, 2007; FARIA et al., 2008).

a. Desenvolvimento geral

- ✓ Análise macroscópica externa

A prole foi avaliada quanto aos possíveis efeitos teratogênicos do EHA-PH sobre os olhos, boca, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e condições da cauda.

- ✓ Peso corporal

As massas corporais dos filhotes foram mensuradas nos dias 1, 7, 14 e 21 pós-natal.

- ✓ Descolamento e abertura dos pavilhões auriculares

Após o nascimento, os animais foram observados quanto ao descolamento bilateral dos pavilhões auriculares e abertura dos mesmos. Estas averiguações foram feitas diariamente até a constatação das variáveis.

✓ Surgimento de lanugo e dos pelos

A progênie foi observada a partir do 1º dia pós-natal, para verificação do surgimento de lanugo e pelos. As observações foram realizadas até a constatação de pelos na cabeça, membros e dorso dos animais.

✓ Abertura palpebral ocular

A progênie foi observada, diariamente, a partir do 12º dia pós-natal, para a verificação da abertura bilateral completa das pálpebras.

✓ Desenvolvimento sexual

Os descendentes machos foram avaliados quanto à ocorrência da descida bilateral dos testículos até a bolsa escrotal. A investigação foi realizada através da palpação, diária, da bolsa escrotal a partir do 14º dia pós-natal e, subsequentemente, até que todos os descendentes apresentassem tal característica.

A progênie feminina foi observada a partir do 30º dia pós-natal, para a verificação da abertura do canal vaginal. Esta análise foi feita, diariamente, até que todas as descendentes exibissem a abertura completa do canal vaginal

b. Desenvolvimento reflexológico

✓ Reflexo de endireitamento

Entre o 1º e 5º dia pós-natal, cada animal foi colocado sobre uma superfície plana em decúbito dorsal e foi medido o tempo gasto para que voltasse à decúbito ventral em até um minuto.

✓ Andar adulto

Os filhotes foram avaliados, a partir do 8º dia pós-natal, para determinação do dia que começaram a exibir o andar adulto, isto é, o dia em que o animal iniciou a ambulação sem arrastar os membros posteriores e sem encostar o ventre no chão.

✓ Geotaxia negativa

Entre o 7º e 11º dias de vida, cada animal foi colocado com as quatro patas sobre um plano inclinado de aproximadamente 30º e de superfície áspera, com a cabeça no sentido descendente. O reflexo foi considerado formado quando o animal era capaz de girar seu corpo em aproximadamente 180º, reorientando-se em até 1 minuto.

c. Análise comportamental

✓ Teste do campo aberto

Quando os animais atingiram o 30º dia pós natal, foi utilizado um aparelho de campo aberto para investigar suas atividades exploratórias, tais como: movimentação espontânea (ambulação), sendo esta verificada pelo número de cruzamentos executados com as quatro patas entre as divisões do campo; execução de autolimpeza; ato de levantar os membros anteriores. O índice de emocionalidade foi avaliado pela contagem do número de bolos fecais. Os animais foram observados por um período de 3 minutos (CARLINI et al., 1986).

4.2.4 Análise estatística

As variáveis com medidas intervalares e que apresentaram distribuição normal foram analisadas através de teste “t” de Student e análise de variância (ANOVA) “one-way”. As diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Bonferroni. Os valores foram considerados diferentes entre si quando $p < 0,05$. As variáveis indicadas como índices ou percentuais foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Utilizou-se o nível de significância estatística de 5% ($\alpha = 0,05$).

Todos os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism® versão 5.01 (Graphpad software inc., USA).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratos Wistar expostos ao extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi*

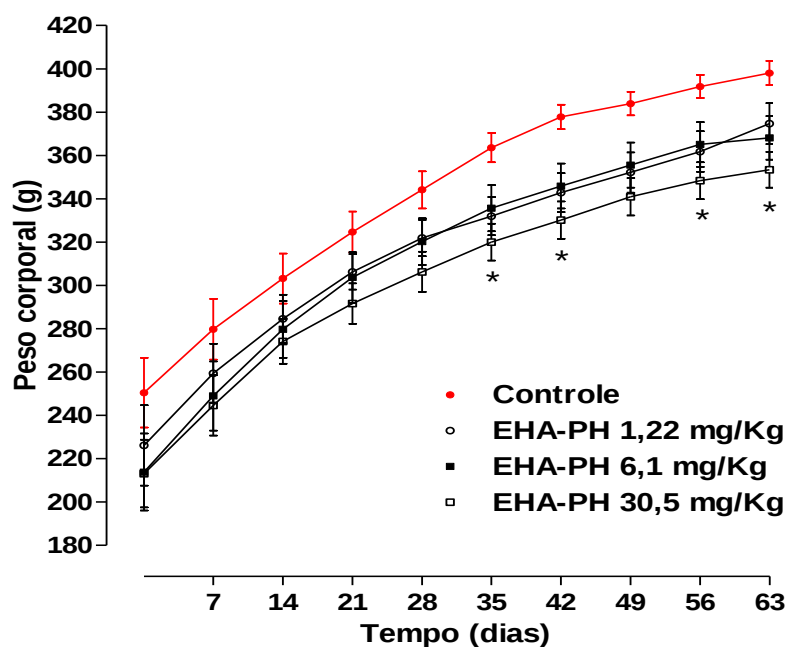
5.1.1 Parâmetros avaliados nos machos

5.1.1.1 Sinais gerais de toxicidade

Durante os procedimentos experimentais, nenhuma morte, alteração da atividade locomotora, ocorrência de piloereção ou qualquer outro sinal clínico de toxicidade foram observados nos grupos controle e tratados com as diferentes doses do EHA-PH.

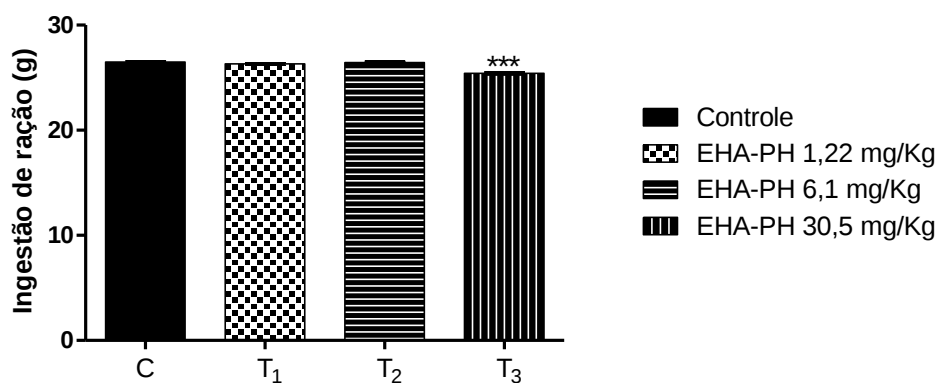
5.1.1.2 Evolução ponderal e consumo de água e ração

Os dados obtidos mostram que a administração do EHA-PH nas doses de 1,22 mg/kg e 6,1 mg/kg não provocou alteração significativa no peso corporal dos ratos, porém houve uma redução no peso dos animais na dose de 30,5 mg/kg, a partir do 35º dia de tratamento (Gráfico 1). O EHA-PH, nas doses de 1,22 mg/kg e 6,1 mg/kg, não alterou a ingestão de alimentos, mas na dose de 30,5 mg/kg verificou-se uma redução na ingestão de ração (Gráfico 2). Em relação ao consumo de água, o EHA-PH não causou mudanças entre os grupos controle e tratados com as doses de 1,22 mg/kg, 6,1 mg/kg e 30,5 mg/kg (Gráfico 3).

Gráfico 1 - Peso de ratos dos grupos controle e tratados com EHA-PH por 63 dias.

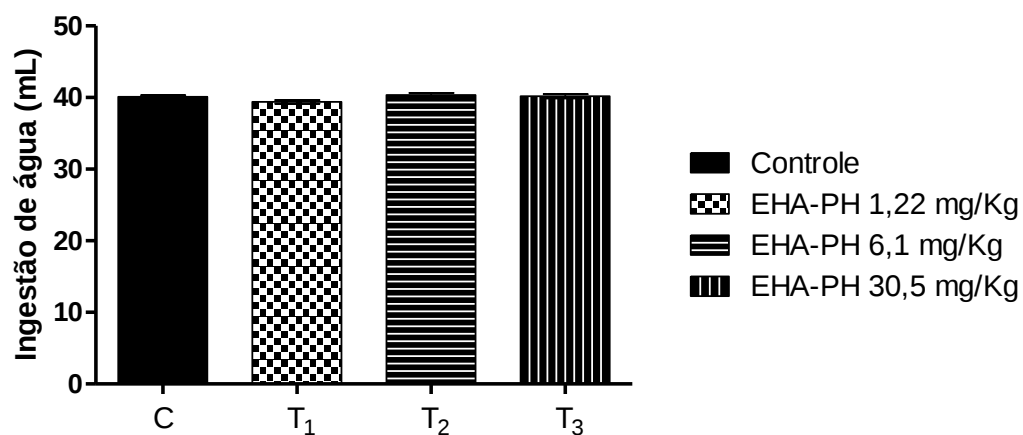
Símbolos e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way”, ($n = 15$), $*p < 0,05$.

Gráfico 2 - Ingestão diária de ração dos animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way", (n = 15). *** $p < 0,001$.

Gráfico 3 - Consumo de água dos animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way", (n = 15).

5.1.1.3 Parâmetros sanguíneos: hematológicos e bioquímicos

O perfil bioquímico dos ratos não foi modificado pela administração oral do EHA-PH, exceto por um aumento significativo nos níveis séricos de albumina (g/dL) na dose de 30,5 mg do EHA-PH quando comparado ao grupo controle (Tabela 1). Os parâmetros hematológicos também não mostraram diferenças significantes entre os grupos controle e tratados com o EHA-PH (Tabela 2).

Tabela 1 - Perfil bioquímico de ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.

Parâmetros	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Glicose (mg/dL)	159,27 ± 13,43	168,67 ± 3,72	153,07 ± 14,1	170,0 ± 4,23
Ureia (mg/dL)	46,13 ± 2,75	43,40 ± 1,75	47,20 ± 2,83	43,0 ± 2,0
Creatinina (mg/dL)	0,51 ± 0,05	0,47 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,47 ± 0,04
Colesterol total (mg/dL)	52,67 ± 2,28	57,53 ± 3,68	57,93 ± 2,64	60,0 ± 3,92
Triglicerídeos (mg/dL)	76,67 ± 10,51	86,47 ± 7,8	78,73 ± 8,1	81,13 ± 8,85
HDL (mg/dL)	23,16 ± 2,8	30,97 ± 4,3	28,12 ± 3,56	28,44 ± 3,49
LDL (mg/dL)	19,35 ± 2,9	16,29 ± 4,3	21,70 ± 3,04	15,33 ± 3,0
VLDL (mg/dL)	15,33 ± 2,1	17,29 ± 1,56	15,75 ± 1,62	16,23 ± 1,78
Ácido úrico (U/L)	1,13 ± 0,23	0,93 ± 0,2	0,93 ± 0,18	1,29 ± 0,27
Amilase (U/L)	641,20 ± 25,44	686,28 ± 45,4	635,80 ± 0,94	651,80 ± 1,0
AST (U/L)	154,27 ± 14,72	137,17 ± 8,77	142,08 ± 9,80	143,54 ± 7,8
ALT (U/L)	60,07 ± 4,71	53,00 ± 3,05	56,60 ± 4,52	54,69 ± 3,36
Albumina (g/dL)	2,42 ± 0,07	2,59 ± 0,08	2,49 ± 0,06	2,70 ± 0,05*

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente (n = 15). ANOVA "one-way". * $p < 0,05$.

Tabela 2 - Perfil hematológico de ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.

Parâmetros	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	9,14 $\pm$ 0,43	9,52 $\pm$ 0,42	9,43 $\pm$ 0,41	9,32 $\pm$ 0,41
Hemoglobina (g/dl)	13,80 $\pm$ 0,37	14,05 $\pm$ 0,24	13,26 $\pm$ 0,63	13,96 $\pm$ 0,22
Hematócrito (%)	41,30 $\pm$ 1,53	42,9 $\pm$ 1,4	42,33 $\pm$ 1,36	42,83 $\pm$ 1,15
VCM (fl)	45,65 $\pm$ 0,99	45,35 $\pm$ 0,87	45,38 $\pm$ 0,99	46,57 $\pm$ 1,22
HCM (pg)	15,51 $\pm$ 0,80	15,17 $\pm$ 0,71	14,63 $\pm$ 0,5	15,37 $\pm$ 0,66
CHCM (g/dl)	33,80 $\pm$ 1,05	33,29 $\pm$ 1,02	32,10 $\pm$ 0,68	32,84 $\pm$ 0,72
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,21 $\pm$ 0,66	6,27 $\pm$ 0,5	5,57 $\pm$ 0,59	6,92 $\pm$ 0,63
Neutrófilos (%)	30,13 $\pm$ 3,24	25,93 $\pm$ 2,29	27,53 $\pm$ 2,06	29,13 $\pm$ 1,9
Eosinófilos (%)	0,80 $\pm$ 0,30	0,73 $\pm$ 0,23	0,53 $\pm$ 0,21	0,67 $\pm$ 0,25
Linfócitos (%)	65,07 $\pm$ 3,50	67,93 $\pm$ 2,0	66,53 $\pm$ 1,79	66,07 $\pm$ 2,05
Monócitos (%)	4,0 $\pm$ 0,60	4,33 $\pm$ 0,77	4,53 $\pm$ 0,60	4,27 $\pm$ 0,73
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	745,0 $\pm$ 18,0	626,20 $\pm$ 55,39	703,80 $\pm$ 3,62	701,27 $\pm$ 4,45

Valores expressos em média $\pm$ e.p.m, respectivamente (n = 15). ANOVA “one-way”.

5.1.1.4 Análise macroscópica dos órgãos vitais e reprodutores

Não foi evidenciada qualquer alteração macroscópica de órgãos vitais e reprodutores dos ratos tratados com as três doses do EHA-PH, considerando-se parâmetros tais como: aspecto, tamanho, cor e forma.

Nenhuma redução significativa foi observada nos pesos absoluto e relativo do fígado, pulmões, coração, cérebro e hipófise e no peso relativo dos rins dos animais tratados com as três doses do EHA-PH. Porém, houve uma redução significativa no peso absoluto dos rins dos animais tratados com a dose de 30,5 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (Tabelas 3 e 4). Os pesos absoluto e relativo de testículos, epidídimo direito, vesícula seminal e próstata dos animais tratados também não se alteraram em relação aos animais do grupo controle (Tabelas 5 e 6).

Tabela 3 - Peso absoluto de órgãos vitais de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.

Órgãos	Peso absoluto (g)			
	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Rim direito	1,39 ± 0,05	1,28 ± 0,04	1,27 ± 0,04	1,19 ± 0,04*
Rim esquerdo	1,35 ± 0,04	1,26 ± 0,05	1,28 ± 0,05	1,16 ± 0,04*
Fígado	14,33 ± 0,59	13,29 ± 0,54	14,07 ± 0,63	12,60 ± 0,47
Pulmões	1,94 ± 0,09	1,75 ± 0,07	1,65 ± 0,11	1,66 ± 0,08
Coração	1,27 ± 0,04	1,23 ± 0,03	1,23 ± 0,04	1,11 ± 0,04
Cérebro	1,34 ± 0,02	1,32 ± 0,03	1,34 ± 0,02	1,28 ± 0,02
Hipófise (mg)	10,0 ± 0,77	9,56 ± 0,52	9,67 ± 0,41	9,41 ± 0,53

Valores expressos em media ± e.p.m., respectivamente (n = 15). ANOVA “one-way”. * $p < 0,05$.

Tabela 4 - Peso relativo de órgãos vitais de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.

Órgãos	Peso relativo (%)			
	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Rim direito	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Rim esquerdo	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Fígado	3,61 ± 0,15	3,55 ± 0,12	3,84 ± 0,16	3,58 ± 0,13
Pulmões	0,48 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,47 ± 0,02
Coração	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01
Cérebro	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,007	0,36 ± 0,01
Hipófise	2,70 ± 0,32	2,50 ± 0,19	2,65 ± 0,13	2,65 ± 0,12

Valores expressos em media ± e.p.m., respectivamente (n = 15). ANOVA “one-way”.

Tabela 5 - Peso absoluto dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.

Órgãos	Controle	Peso absoluto (g)		
		EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Testículo direito	1,65 ± 0,05	1,65 ± 0,04	1,59 ± 0,05	1,58 ± 0,04
Testículo esquerdo	1,66 ± 0,05	1,65 ± 0,04	1,61 ± 0,04	1,60 ± 0,04
Vesícula seminal	1,39 ± 0,10	1,45 ± 0,07	1,26 ± 0,07	1,36 ± 0,08
Epidídimo direito	0,63 ± 0,02	0,59 ± 0,03	0,57 ± 0,02	0,54 ± 0,02
Próstata	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,02

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente (n = 15). ANOVA “one-way”.

Tabela 6 - Peso relativo dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias de animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH durante 63 dias.

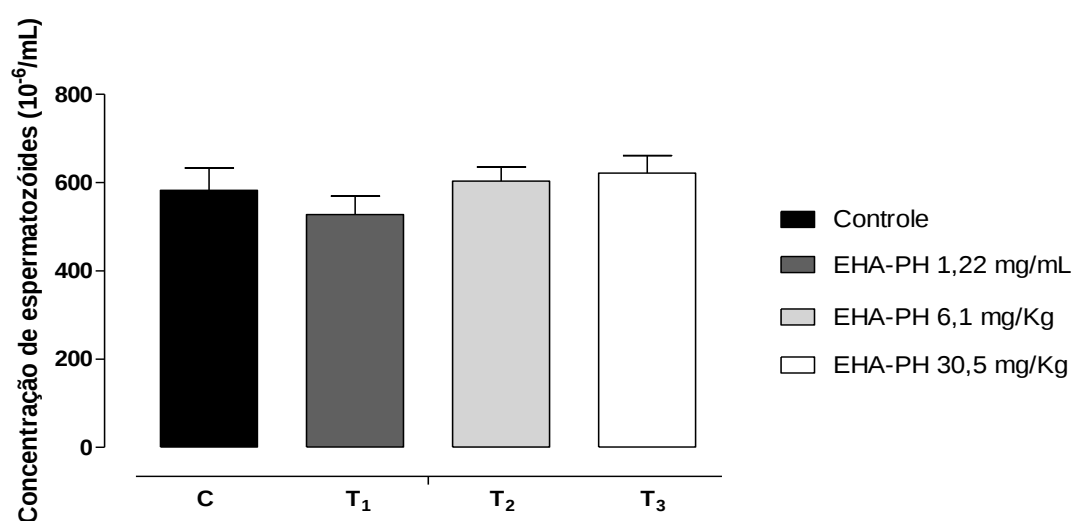
Órgãos	Controle	Peso relativo (%)		
		EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Testículo direito	0,42 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,01
Testículo esquerdo	0,42 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,45 ± 0,01
Vesícula seminal	0,35 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,39 ± 0,02
Epidídimo direito	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,06	0,15 ± 0,01
Próstata	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente (n = 15). ANOVA “one-way”.

5.1.1.5 Índice de fertilidade

A concentração de espermatozoides (Gráfico 4) e a proporção de espermatozoides normais e anormais (sem cauda, sem cabeça e com cauda curta ou enrolada) (Tabela 7) não diferiram entre os animais dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.

Gráfico 4 - Concentração de espermatozoides na secreção da cauda do epidídimo esquerdo de ratos nos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way", (n = 15).

Tabela 7 - Proporção de espermatozoides normais e anormais de ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH por 63 dias.

Espermatozoides	Concentração de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$)			
	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Normal	96,03 $\pm$ 0,22	95,92 $\pm$ 0,34	96,02 $\pm$ 0,32	95,45 $\pm$ 0,34
Somente cabeça	2,17 $\pm$ 0,08	2,36 $\pm$ 0,17	2,56 $\pm$ 0,17	2,68 $\pm$ 0,29
Somente cauda	1,17 $\pm$ 0,14	1,15 $\pm$ 0,19	0,88 $\pm$ 0,10	1,09 $\pm$ 0,11
Cauda curta	0,23 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,007	0,20 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,04
Cauda longa	0,39 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,07

Valores expressos em média $\pm$ e.p.m., respectivamente (n = 15). ANOVA “one-way”.

5.1.2 Parâmetros avaliados nas fêmeas não tratadas

5.1.2.1 Índices de fertilidade e de reprodução

a. Parâmetros avaliados nas fêmeas que tiveram a gravidez interrompida no 15^o dia de gestação

✓ Índices de fertilidade e reprodução

A administração do EHA-PH não interferiu no acasalamento dos ratos e para todas as ratas acasaladas verificou-se a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (índice de acasalamento – 100%). No entanto, houve um aumento de 14,3% e 10,8% nos índices de perda pré-implantação e uma redução de 14,3% e 10,8% nos índices de implantação das ratas acasaladas com ratos tratados com 6,1 mg/kg e 30,5 mg/kg do EHA-PH, respectivamente. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas do número de corpos lúteos, implantações, reabsorções e índice de gestação (Tabela 8). Não foram observadas malformações externas.

Tabela 8 - Variáveis reprodutivas em ratas (com gravidez interrompida no 15º dia) acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com EHA-PH.

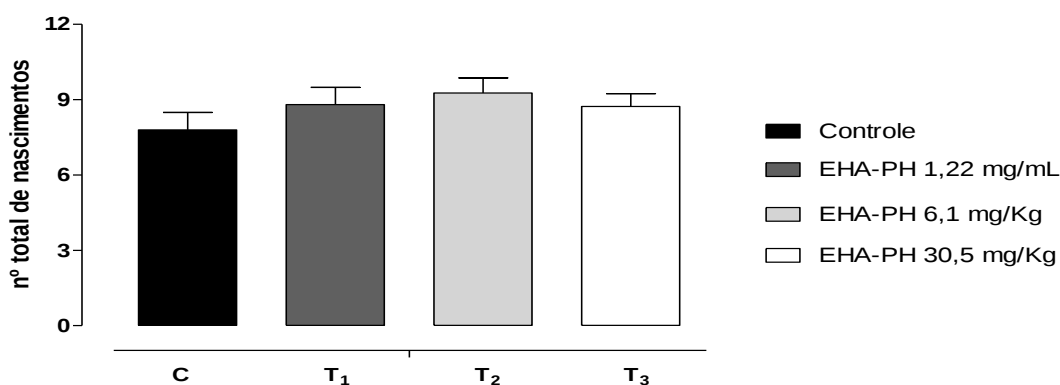
Variáveis	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Fêmeas acasaladas	15	15	15	15
Fêmeas inseminadas	15	15	15	15
Fêmeas com implantes	13	12	12	15
Índice de acasalamento	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)
Índice de gestação	86,7% (13/15)	80,0% (12/15)	80,0% (12/15)	100% (15/15)
Corpos lúteos	185	194	197	182
Implantes	140	131	121	163
Reabsorções	3	3	7	5
Perdas pré-implantação	24,3% (45/185)	32,5%(63/194)	38,6%* (76/197)	35,1%*(68/194)
Índice de implantação	75,7% (140/185)	67,5%(131/194)	61,4%*(121/197)	64,9%* (126/194)

*Diferença significativa em relação ao controle (n = 15). Teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

b. Parâmetros avaliados nas fêmeas acompanhadas durante todo o período gestacional (21 dias)

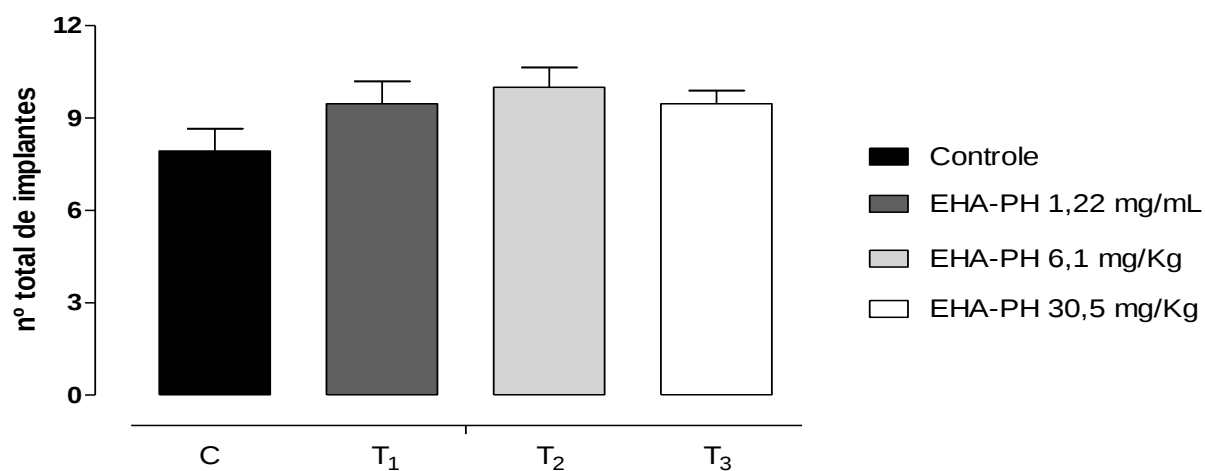
Nenhuma das doses investigadas do EHA-PH interferiu no número total de nascimentos (Gráfico 5, Tabela 9), número de implantes (Gráfico 6), e número de animais desmamados (Gráfico 7, Tabela 9). As fêmeas acasaladas com ratos que receberam a dose de 6,1 mg/kg do EHA-PH, tiveram o maior número de filhotes nascidos (Tabela 9). Os índices de nascimento e viabilidade não diferiram entre os grupos controle e tratados com o EHA-PH, porém houve um aumento de 5,6% e 8,2% no índice de perda pós-implantação das ratas acasaladas com ratos expostos às doses de 6,1 mg/kg e 30,5 mg/kg do EHA-PH, respectivamente. Também observou-se um decréscimo no índice de desmame para as ratas acasaladas com ratos tratados com a dose intermediária do extrato (Tabela 10).

Gráfico 5 - Número de filhotes nascidos de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.



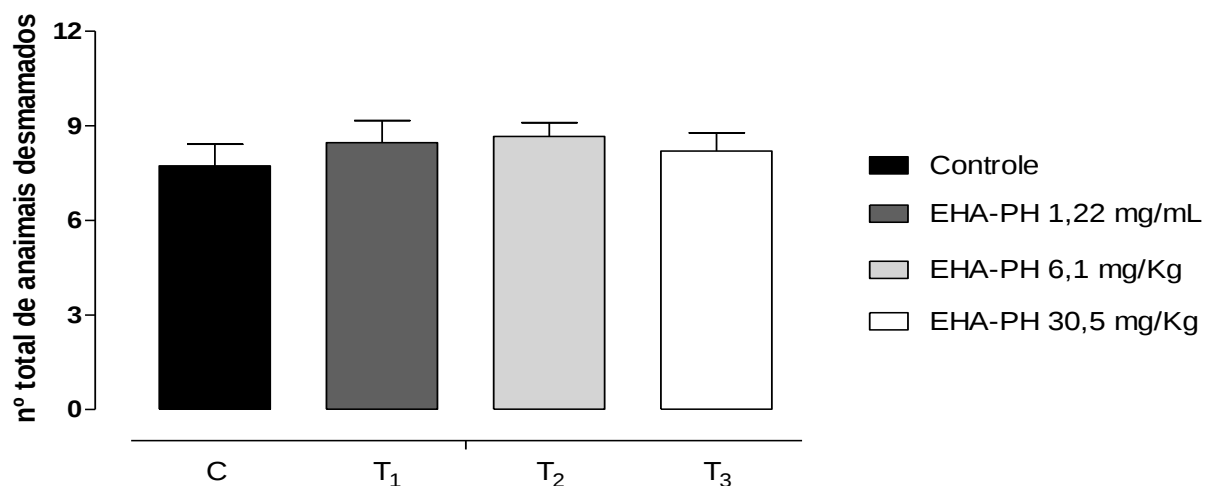
As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way", (n = 15).

Gráfico 6 - Número de implantes de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way”, (n = 15).

Gráfico 7 - Número de animais desmamados de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way”, (n = 15).

Tabela 9 – Machos e fêmeas nascidos e desmamados de fêmeas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.

	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Machos nascidos	65	70	63	63
Fêmeas nascidas	52	62	76	68
Total de nascidos	117	132	139	131
Total de nascidos vivos	117	132	139	128
Machos desmamados	65	67	57	59
Fêmeas desmamadas	51	60	73	64
Total de desmamados	116	127	130	123

n = 30

Tabela 10 - Variáveis reprodutivas em ratas acasaladas com ratos do grupos controle e tratados com EHA-PH.

Variáveis	Controle	EHA-PH 1,22 mg/kg	EHA-PH 6,1 mg/kg	EHA-PH 30,5 mg/kg
Índice de nascimento	100% (117/117)	100% (132/132)	100% (139/139)	97,7% (128/131)
Índice de viabilidade	100% (117/117)	100% (132/132)	100% (139/139)	100% (128/128)
Índice de desmame	99,1% (116/117)	96,2% (127/132)	93,5%* (130/139)	96,1% (123/128)
Índice de perdas pós-implantação	1,7% (2/119)	7,0% (10/142)	7,3%* (11/150)	9,9%* (14/142)

*Diferença significativa em relação ao controle (n = 15). Teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

5.1.3 Parâmetros avaliados na progênie

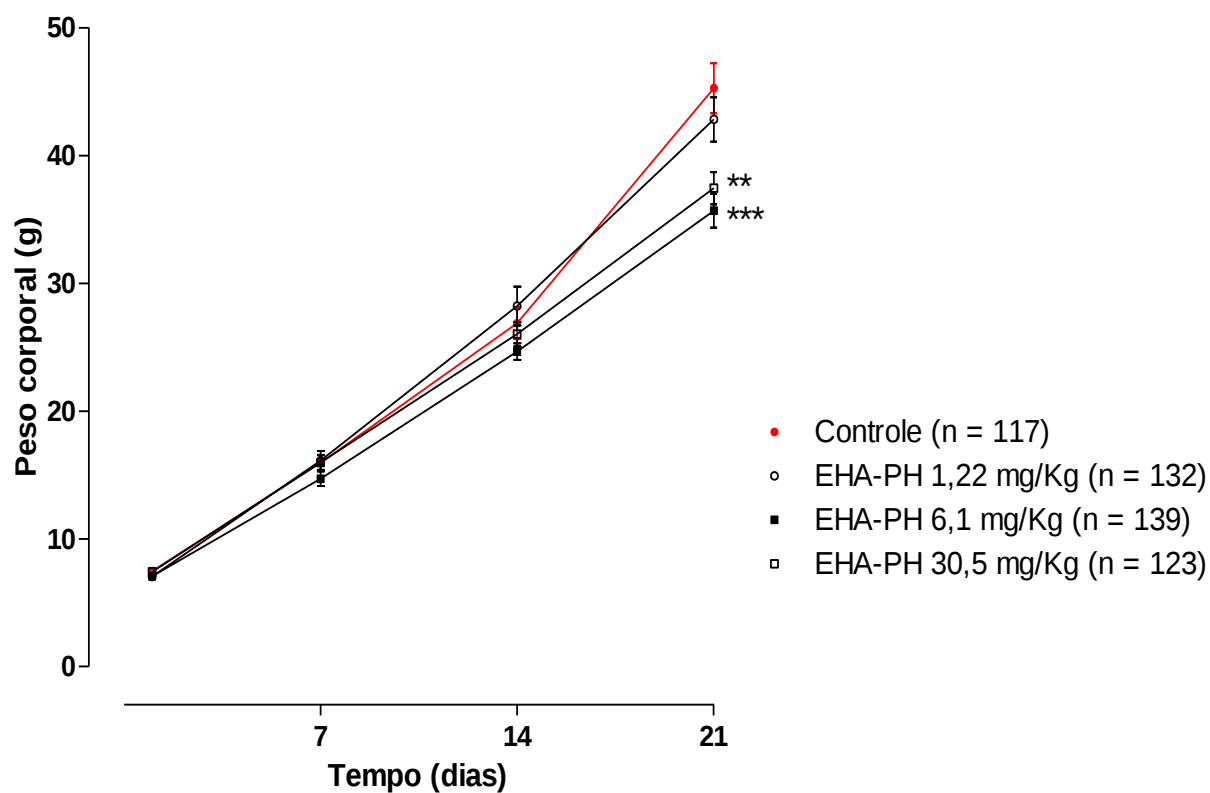
a. Desenvolvimento geral

A administração do EHA-PH na dose de 1,22 mg/kg, a ratos machos, não provocou alteração significativa no peso corporal de seus descendentes, porém houve uma redução significativa no peso da prole proveniente do acasalamento de ratas não tratadas com ratos tratados nas doses de 6,1 mg/kg e 30,5 mg/kg, observado no 21 dia pós-natal (Gráfico 8).

O período (dias) para crescimento de lanugo e de pelos, início de erupção dos incisivos, descolamento e abertura auricular, abertura dos olhos, descida bilateral dos testículos e abertura do canal vaginal não diferiram entre os descendentes de ratas acasaladas com ratos expostos ao extrato de *P. huberi* e os que receberam apenas veículo (Tabela 11).

Foram observados três fetos natimortos, dois deles com evidências de malformação (Figura 8A) e um feto com presença de hérnia abdominal (Figura 8B), provenientes de progenitoras acasaladas com ratos expostos à dose de 30,5 mg/kg do EHA-PH. Nenhum animal do grupo controle apresentou tais anormalidades (Figura 8C).

Gráfico 8 - Peso da prole de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.



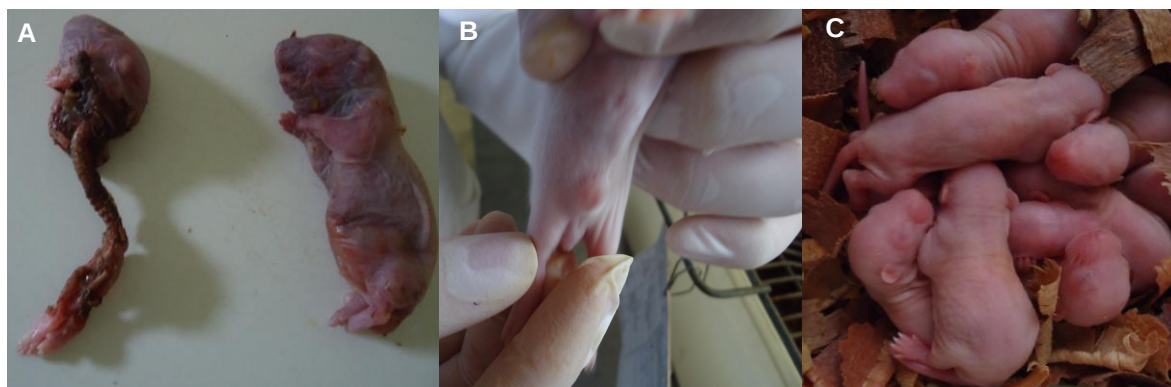
Valores expressos em média $\pm$ e.p.m., respectivamente. n = número de filhotes. ANOVA "one-way". ** $P < 0,001$.

Tabela 11 - Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos descendentes machos (M) e fêmeas (F) de ratas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.

	Controle n = 65 (M) 52 (F)	EHA-PH 1,22 mg/kg n = 70 (M) 62 (F)	EHA-PH 6,1 mg/kg n = 63 (M) 76 (F)	EHA-PH 30,5 mg/kg n = 59 (M) 64 (F)
Lanugo	5,74 ± 0,29	5,64 ± 0,25	6,25 ± 0,28	6,64 ± 0,34
Pelos	11,71 ± 0,34	11,07 ± 0,35	10,71 ± 0,22	11,71 ± 0,30
Erupção incisivos (início)	10,43 ± 0,33	11,45 ± 0,34	11,36 ± 0,41	10,54 ± 0,30
Abertura ocular	15,47 ± 0,35	15,32 ± 0,29	15,50 ± 0,36	15,41 ± 0,26
Descolamento auricular	4,72 ± 0,35	4,65 ± 0,39	6,08 ± 0,42	5,36 ± 0,60
Abertura pavilhão auricular	15,30 ± 0,32	15,31 ± 0,36	15,91 ± 0,40	14,93 ± 0,41
Abertura canal vaginal	32,74 ± 0,80	30,56 ± 0,72	32,86 ± 0,54	33,56 ± 0,72
Descida testículos	15,91 ± 0,29	16,92 ± 0,24	16,22 ± 0,31	15,22 ± 0,35

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way”.

Figura 9 – Fetos de progenitoras acasaladas com ratos expostos à dose de 30,5 mg/kg do EHA-PH (A e B) e grupo controle (C). Malformações fetais (A) e (B), com presença de hérnia abdominal (B). Desenvolvimento normal de descendentes de ratos do grupo controle (C).



b. Desenvolvimento reflexológico

A tabela 12 mostra os sinais de desenvolvimento reflexológico da prole de ratas acasaladas com ratos controle e tratados com o EHA-PH. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros analisados.

Tabela 12 - Desenvolvimento reflexológico (em dia de aparecimento) da prole de ratas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.

	Controle n = 117	EHA-PH 1,22 mg/kg n = 132	EHA-PH 6,1 mg/kg n = 139	EHA-PH 30,5 mg/kg n = 123
Andar adulto	9,13 ± 0,27	9,2 ± 0,26	9,2 ± 0,31	9,27 ± 0,28
Geotaxia negativa	8,07 ± 0,18	7,90 ± 0,24	7,67 ± 0,25	8,07 ± 0,21
Endireitamento	4,0 ± 0,17	4,27 ± 0,18	4,4 ± 0,19	4,47 ± 0,26

Valores expressos em media ± e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way".

c. Análise comportamental

A tabela 13 mostra que não houve alterações significativas nos parâmetros comportamentais avaliados (ambulação, número de execuções de levantar e de limpeza, e o parâmetro defecação, avaliado pelo número de bolos fecais), quando comparado ao grupo controle.

Tabela 13 - Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto na prole de ratas acasaladas com machos dos grupos controle e tratados com o EHA-PH.

	Controle n = 116	EHA-PH 1,22 mg/kg n = 127	EHA-PH 6,1 mg/kg n = 130	EHA-PH 30,5 mg/kg n = 123
Ambulação (frequência)	43,62 ± 2,55	40,65 ± 3,39	44,70 ± 2,00	41,00 ± 2,94
Levantadas (frequência)	16,44 ± 1,29	16,05 ± 1,62	14,39 ± 1,17	11,48 ± 1,54
Limpeza (segundos)	5,18 ± 1,08	5,12 ± 0,89	4,72 ± 0,47	6,02 ± 1,67
Bolos fecais (frequência)	4,0 ± 0,52	3,36 ± 0,53	3,10 ± 0,31	3,26 ± 0,4

Valores expressos em media ± e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way".

Discussão

6 DISCUSSÃO

Há milhares de anos, as plantas são utilizadas com fins medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças com suas propriedades terapêuticas sendo propagadas de geração em geração (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Atualmente, apesar do avanço dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos estudos estão sendo realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, e muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular já bem estabelecido (TUROLLA; NASCIMENTO 2006).

A maioria dos produtos derivados de plantas utilizados culturalmente no Brasil não possui estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva, portanto o efeito de muitas dessas substâncias sobre o sistema reprodutor ainda é desconhecido (MÜLLER, 2007).

A espécie *P. huberi* é bastante utilizada na medicina popular pelas comunidades amazônicas, por suas atividades gastroprotetora e antiulcerogênica. Entretanto, são poucos os estudos sobre sua atividade toxicológica, especialmente sobre a sua toxicidade reprodutiva. Vários componentes foram identificados na constituição química de *P. huberi*, com a presença de metabólitos secundários, como flavonoides, saponinas, esteroides e triterpenos, considerados responsáveis pelas propriedades terapêuticas dessa espécie vegetal, mas os mesmos são também capazes de exercer ação adversa no organismo, incluindo o sistema reprodutor, como evidenciado em ensaios toxicológicos prévios.

Por exemplo, estudos realizados por Delclos e colaboradores (2001) demonstraram que, em ratos, a genisteína, uma isoflavona presente na soja, pode interferir na espermatogênese e reduzir o número de espermatozoides presentes no epidídimo. Outros estudos evidenciaram que o extrato das sementes de *Vitex negundo*, rico em flavonoides, interferiu na fertilidade de ratos, causando uma redução no peso dos órgãos sexuais desses animais, além de um decréscimo no número de espermatozoides e alteração em sua motilidade (DAS et al., 2004). Ensaio realizados com saponinas e triterpenoides isolados de *Acacia auriculiformis* revelaram atividade espermicida e a capacidade desses metabólitos em interferir na motilidade do espermatozoide humano (PAKRASHI et al., 1991).

Os testes de toxicidade reprodutiva são realizados para definir os efeitos diretos de um agente tóxico exógeno sobre o sistema reprodutor. A exposição paterna ou materna a esses agentes, em períodos críticos de desenvolvimento embriológico e fetal, pode afetar os processos reprodutivos, comprometendo a fertilidade e o desenvolvimento pré e pós-natal (NEUBERT; CHAHOUD, 1995; DALLEGRAVE, 2003; HOLLENBACH, 2008; HOLLENBACH, et al., 2010). Esses ensaios envolvem a avaliação de variáveis reprodutivas e também tomam por base os parâmetros clínicos de toxicidade sistêmica, pois um animal debilitado pode ter o seu potencial de fecundidade e fertilidade diminuído (SILVA, 2010).

Nesse estudo, investigou-se a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* sobre o sistema reprodutor, os órgãos vitais e a prole de ratos Wistar adultos. O extrato foi administrado, via gavagem, a três grupos experimentais, nas doses de 1,22, 6,1 e 30,5 mg/ kg de peso corporal, durante 63 dias, período que compreende o ciclo espermatogênico completo dessa espécie mais o período de trânsito epididimário (SOMKUTI et al., 1987; COOPER, 2009).

O potencial tóxico do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* foi estudado seguindo os protocolos experimentais relevantes à avaliação da toxicidade dessa espécie vegetal sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar, utilizando-se fatores como a ocorrência de sinais clínicos gerais de toxicidade, consumo diário de água e ração, análises bioquímicas e hematológicas, massa corporal, peso de órgãos vitais (fígado, rins pulmão, cérebro e hipófise), peso dos órgãos reprodutores (testículos e epidídimo direito) e das glândulas sexuais acessórias (próstata e vesícula seminal).

A avaliação do peso corporal durante o tratamento com uma determinada substância fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais em experimentação, e essa informação pode ser relevante para a interpretação dos efeitos reprodutivos. Uma redução na massa corporal ou um decréscimo no ganho de massa pode evidenciar uma variedade de respostas, incluindo anorexia induzida pelo tratamento, ou toxicidade sistêmica (EPA, 1996; SÁ, 2003; MÜLLER, 2007).

A exposição oral, por 63 dias, ao EHA-PH nas doses de 1,22 e 6,1 mg/kg não alterou o peso corporal de ratos, entretanto a administração da maior

dose do extrato (30,5 mg/kg) causou redução do peso corporal dos animais a partir do 35º dia de tratamento. Esse achado foi corroborado pela diminuição na ingestão de ração por esses animais, sugerindo a ocorrência de efeitos tóxicos causados pela administração da maior dose do EHA-PH. Resultados semelhantes foram demonstrados por Rocha (2008), em ensaios de toxicidade aguda e crônica realizados em ratos, em que a administração do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* provocou diminuição da massa corporal de forma significativa, associada à redução da ingestão de água e alimentos. No presente estudo, não foram evidenciados sinais clínicos indicativos de toxicidade, como comprometimento do sistema locomotor e piloereção, além de não ter ocorrido nenhuma morte de animais expostos às diferentes doses do EHA-PH.

Em ensaios pré-clínicos de toxicidade reprodutiva, o monitoramento do funcionamento de órgãos vitais concomitante ao tratamento com determinada substância também é importante, pois alterações nesses órgãos podem comprometer o processo reprodutivo (SÁ, 2003; SILVA, 2010). Mudanças significativas nas massas absolutas e relativas de órgãos vitais podem indicar a ocorrência de um efeito adverso e a avaliação da massa absoluta de um órgão é importante porque uma diminuição nesse parâmetro pode ocorrer sem, necessariamente, estar relacionada com a redução da massa corporal (EPA, 1996; BÚFALO, 2007).

O fígado e os rins possuem determinados sistemas enzimáticos que afetam biologicamente a meia vida dos hormônios esteroidais e de outros hormônios. Dessa forma, xenobióticos capazes de interferir com os processos de biotransformação e eliminação são capazes de alterar o sistema endócrino, causando danos ao sistema reprodutivo (CLAPALCH et al., 2002; DALLEGRAVE, 2003). Trabalhos demonstraram que substâncias com atividade estrogênica, como flavonoides, podem atuar como desreguladores endócrinos, acarretando disfunções reprodutivas importantes no sexo masculino, como diminuição do peso dos testículos, da contagem espermática no epidídimo, da motilidade espermática e da atividade de enzimas testiculares envolvidas na biossíntese de testosterona (MANI et al., 2002; ARENA, 2006). Neste estudo, foi observado que o peso absoluto e relativo do fígado, pulmão, coração e cérebro não foram afetados pelo tratamento com o EHA-PH, porém, houve uma redução significativa no peso

absoluto dos rins dos animais tratados com a dose de 30,5 mg/kg do extrato, quando comparado ao grupo controle. Como nenhuma mudança foi observada no peso relativo desses órgãos, este dado sugere a ausência de efeito tóxico direto do EHA-PH sobre os rins, já a redução no peso absoluto dos mesmos pode ser explicada pela redução no peso corporal dos ratos tratados com a dose de 30,5 mg do extrato. A análise macroscópica dos órgãos vitais, levando-se em consideração aspectos tais como forma, tamanho, peso e cor, não evidenciou qualquer alteração causada pelo tratamento com o EHA-PH. Estes resultados sugerem que o extrato não exerceu efeito tóxico específico sobre os órgãos vitais de ratos durante os 63 dias de tratamento, entretanto tais resultados não eliminam a possibilidade do EHA-PH exercer algum tipo de efeito adverso sobre o sistema reprodutor desses animais, pois um agente químico pode afetar um determinado órgão sem necessariamente alterar o metabolismo sistêmico. Paul e colaboradores (2010) demonstraram que o extrato hidroalcoólico composto das folhas de *Stephania hernandifolia* e raízes de *Achyranthes Aspera* na proporção de 1:3 e na dose de 80 mg/100g de peso corporal não induziu toxicidade hepática ou renal em ratos, porém interferiu com o sistema reprodutor causando alterações como diminuição na contagem e motilidade de espermatozoides, e decréscimo nos níveis de testosterona e no peso de órgãos reprodutores.

A bioquímica e a hematologia são importantes áreas de estudo sobre o estado de saúde dos animais e a análise de seus parâmetros é útil na avaliação da toxicidade reprodutiva. As dosagens séricas das enzimas hepáticas AST e ALT têm sido utilizadas na investigação e monitoramento das doenças hepáticas (PINTO et al., 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; TEIXEIRA et al., 2009). A ALT é uma enzima encontrada em grande quantidade nos hepatócitos dos ratos, sendo considerada específica para lesão hepática nestas espécies (SILVEIRA, 1988; LOEB, 1997). Dentre as principais patologias do fígado em que os níveis dessa enzima encontram-se elevados está a hepatite infecciosa, hepatite tóxica e processos tóxico-químicos (SILVEIRA, 1988, PINTO et al., 2005). A avaliação de alterações hepáticas é um dado relevante nos estudos de toxicidade reprodutiva, pois essas alterações podem interferir no processo reprodutivo, através de modificações nos níveis circulantes dos hormônios sexuais (FERREIRA; MEDEIROS, 2000). Nesse experimento, não houve

elevação dos níveis séricos das enzimas ALT e AST, indicando que o tratamento com o EHA-PH não desencadeou hepatotoxicidade nos animais tratados.

A albumina é a proteína mais abundante no plasma e equivale a cerca de 50% do total de proteínas. É sintetizada no fígado e contribui com 80% da osmolaridade do plasma sanguíneo, constituindo, também, uma importante reserva proteica (OLIVEIRA, 2007). A concentração de albumina plasmática pode diminuir (hipoalbuminemia) em várias situações como em doenças hepáticas crônicas, na doença renal e em estados de desnutrição. Já o aumento nos níveis séricos dessa proteína (hiperalbuminemia) é raro, podendo ser causado por desidratação ou choque (WILKINSON; MENDEHALL, 1963; OLIVEIRA, 2007). Estudos demonstraram que, em pacientes desnutridos e em processo de recuperação, ocorre uma diminuição na taxa de degradação da albumina, indicando assim uma resposta compensatória à baixa ingestão de proteínas (JAMES; HAYS, 1968; OLIVEIRA, 2007). No presente estudo, observou-se um aumento significativo na concentração plasmática de albumina dos ratos tratados com a dose de 30,5 mg/kg do extrato, o que pode ter sido provocado pela diminuição no consumo de ração por esses animais, estabelecendo assim um equilíbrio em relação ao baixo consumo de proteínas.

Os níveis séricos de ureia e ácido úrico são parâmetros importantes de diagnóstico da insuficiência renal, embora não sejam tão específicos quanto à dosagem de creatinina (principal indicador da função renal) (AL-HABORI et al., 2002). A elevação dos níveis de creatinina no sangue é observada quando há lesão aos néfrons funcionantes (TEIXEIRA et. al, 2009). O estudo realizado revelou ausência de alterações nesses parâmetros bioquímicos no plasma dos animais tratados com o EHA-PH, mesmo nas maiores doses utilizadas, sugerindo ausência de dano renal relacionado ao uso desse extrato. Ensaio realizado em ratas Wistar com o extrato hidroalcoólico das flores de *Calendula officinalis* L. demonstraram que a administração subcrônica desse extrato, na maior dose estudada (30,5 mg/kg), aumentou significativamente os níveis séricos de ureia e ALT, induzindo sobrecargas renais e hepáticas, respectivamente (SILVA et al., 2005).

De forma geral, a administração do EHA-PH não induziu modificações no perfil bioquímico de ratos, exceto para os valores de albumina

sérica que apresentou aumento significativo em ratos tratados com a maior dose do extrato. Esses resultados sugerem ausência de prejuízos hepáticos e renais, diante do tratamento com as diferentes doses do EHA-PH, fato corroborado pela análise macroscópica e avaliação dos pesos do fígado e rins que também não revelaram nenhuma alteração quando comparado ao grupo controle.

O hemograma é um método de avaliação de diagnóstico e prognóstico de enfermidades e permite uma quantificação dos elementos celulares do sangue. É constituído pelo eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas (SWENSON, 1988; JAIN, 1993; DESCAT, 2002; FAILACE, 2003). Através do leucograma, pode ser feita a análise das células de defesa do organismo e, dessa forma, avaliar a capacidade de resposta destas células em diferentes situações (DESCAT, 2002; MESSIAS et al., 2009). Alterações nos parâmetros hematológicos podem indicar toxicidade hematológica derivada do tratamento com uma determinada substância que pode ser evidenciada principalmente pela ocorrência de trombocitopenia, neutropenia e anemia (MESSIAS et al., 2009). A administração do EHA-PH parece não exercer nenhum efeito tóxico no sangue dos ratos tratados já que nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos foi evidenciada pelo tratamento.

O eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal regula a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que atuam diretamente nos testículos e também influenciam o comportamento funcional das glândulas sexuais acessórias (SOKOL, 1997). Dessa forma, o peso da hipófise é outra variável bastante útil na avaliação da toxicidade reprodutiva, já que alterações no funcionamento dessa glândula podem comprometer o desenvolvimento e o funcionamento normal do sistema reprodutor masculino, interferindo com a produção dos hormônios sexuais e com a produção de gametas (MAHONY; HODGEN, 1995; EPA, 1996). Nesse estudo, a hipófise dos animais tratados com as três doses do EHA-PH também não teve seu peso alterado, sugerindo que, em relação a esse parâmetro, o extrato não agiu como um desregulador endócrino e não levou à ocorrência de anormalidades reprodutivas.

Além da avaliação das massas corporal e de órgãos vitais, a análise do peso de órgãos reprodutores e das glândulas sexuais acessórias consiste em um parâmetro essencial usado nos ensaios pré-clínicos de toxicidade reprodutiva.

Ele permite avaliar, especificamente, a resposta do sistema reprodutor em relação ao organismo como um todo, pois alterações no peso absoluto ou relativo desses órgãos podem fornecer evidências capazes de classificar um agente como potencialmente tóxico ao sistema reprodutor (ZENICK; CLEGG, 1989; CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001).

A administração de substâncias tóxicas ou os produtos de sua biotransformação no organismo podem atravessar a barreira testicular, atuar sobre os tipos celulares existentes no testículo, e interferir na espermatogênese. O peso normal do testículo varia muito pouco dentro de uma mesma espécie e essa baixa variabilidade é indicativo de que o peso absoluto do testículo é um parâmetro preciso na avaliação de lesão gonadal (BLAZAK et al., 1985; FOOTE et al., 1986; KU et al., 1993; CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001). Além disso, os pesos da próstata e vesícula seminal são também andrógeno-dependentes e esse parâmetro pode refletir as mudanças no estado endócrino ou função testicular do animal (EPA, 1996).

Ensaios realizados em camundongos Swiss, submetidos ao tratamento crônico com o extrato de *Ginkgo biloba*, rico em flavonoides, mostraram que esse extrato causou o aumento do peso da próstata e do epidídimo desses animais, sem, no entanto alterar a contagem, mobilidade e morfologia dos espermatozoides, mostrando uma redução significativa na taxa de prenhez e aumento de perdas embrionárias pós-implantação em fêmeas inseminadas por esses machos (AL-YAHYA et al., 2006). Na presente pesquisa, não se evidenciou nenhuma mudança significativa nos pesos dos testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal dos ratos expostos ao EHA-PH. A ausência de diminuição no peso dessas estruturas reprodutivas indica que o EHA-PH não interferiu na integridade funcional dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias, fato corroborado pela ausência de alterações macroscópicas nessas estruturas. De forma semelhante, estudos realizados por Sá (2003) demonstraram que, em ratos Wistar, a administração do extrato de *Mikania glomerata*, espécie que apresenta entre seus constituintes químicos flavonoides e esteroides, também encontrados em *P. huberi*, não causou alteração estrutural ou funcional dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias desses

animais, resultado evidenciado pela não diminuição do peso dos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias.

Em ensaios de toxicidade sobre o sistema reprodutor masculino, é fundamental a avaliação da concentração e da qualidade dos espermatozoides, pois reduções no número e produção diária desses gametas bem como o aumento na concentração de gametas anormais e alterações na morfologia espermática refletem mutagenicidade das células germinativas (BLAZAK; ERNST; STEWART, 1985; ZENICK et al., 1994; EPA, 1996).

O processo de maturação dos espermatozoides de mamíferos ocorre durante sua passagem pelo epidídimo (CUASNICU et al., 2002; OLSON et al., 2002). Em ratos, a partir do momento em que os espermatozoides atingem a parte proximal da cauda do epidídimo, adquirem a capacidade para a motilidade, refletindo no sucesso da fertilização (ZENICK et al., 1994). Alterações que aceleram ou retardam o tempo de trânsito dos espermatozoides através do epidídimo tem um importante papel na maturação dos espermatozoides, podendo modificar os parâmetros seminais como a quantidade, a morfologia e a motilidade desses gametas (KLINEFELTER et al., 2002; FERNANDEZ et al., 2007).

A morfologia espermática é um parâmetro utilizado na detecção de toxicidade espermática e está associada a aspectos estruturais dos espermatozoides, podendo proporcionar a identificação de anormalidades na cabeça e/ou na cauda do gameta (ZENICK et al., 1994). Ensaios realizados em animais de laboratório e em seres humanos sugeriram que espermatozoides anormais podem ser incapazes de alcançar a tuba uterina, ou de participar da fertilização e, quanto maior o número de espermatozoides anormais na ejaculação, menor é a probabilidade do macho fecundar a fêmea (NESTOR; HANDEL, 1984; REDI et al., 1984). Estudos realizados em camundongos machos mostraram que a administração do extrato aquoso de *Mentha arvensis*, durante 20 dias, suprimiu a fertilidade desses animais, causando redução do número e motilidade dos espermatozoides e diminuição do peso dos testículos e epidídimo (SHARMA et al., 1996; SHARMA; JACOB, 2001).

Nesse trabalho, a produção de gametas e a sua morfologia não foram modificadas pelo tratamento com o EHA-PH, considerando que as proporções de espermatozoides normais e anormais foram comparativamente

semelhantes entre os animais dos grupos controle e tratado. A ausência de alterações sobre a massa e morfologia dos órgãos reprodutivos reforça a ideia de que o EHA-PH não possui ação contraceptiva em ratos, uma vez que, nessa espécie, reduções das massas do testículo e do epidídimo são indicadores que revelam redução da fertilidade ou atividade contraceptiva (QUIAN, 1984; JAHN; GÜNZEL, 1997; GUPTA et al., 2001; DIMECH, 2006). Juntos, esses tecidos são responsáveis pela formação e maturação dos espermatozoides, além da produção de hormônios (MOUNDIPA et al., 1999). Porém, de acordo com Dalsenter (1999) e colaboradores, a ausência desses efeitos não pode negligenciar alterações significativas em outras variáveis mais sensíveis, utilizadas em ensaios de toxicidade reprodutiva.

Os estudos de fertilidade avaliam o resultado do acasalamento após o período de pré-tratamento em pelo menos um dos sexos. A avaliação da fertilidade e da consequente prenhez fornece importantes informações das consequências funcionais de um agente químico sobre o sistema reprodutor (EPA, 1996). O comportamento sexual em ratos machos é regulado por vários sistemas neurotransmissores e endócrinos (BITRAN; HULL, 1987; CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001). A administração de um agente químico pode causar uma diminuição na concentração plasmática de testosterona, necessária à realização do comportamento copulatório e consequentemente pode aumentar a latência para o início da cópula em animais (HARDING; MCGINNIS, 2004). O comportamento sexual masculino também pode ser influenciado por componentes olfatórios (CAVALCANTE et al., 2006), já que os feromônios femininos levam ao aumento da concentração de testosterona no macho e a mudanças comportamentais através de vias neurais correlacionadas a este processo (MACRIDES et al., 1975; HALPERN; MARTÍNEZ-MARCOS, 2003).

Neste contexto, o teste do letal dominante é um teste realizado para detectar os efeitos mutagênicos de determinadas substâncias em machos ou fêmeas, através da avaliação de interferências sobre as células germinativas durante a espermatogênese ou ovogênese, com o potencial de ser letal para a prole (EPA, 1996). Nesses ensaios, os animais, machos ou fêmeas, são expostos ao composto teste e acasalados com fêmeas virgens ou machos não tratados,

respectivamente, para avaliação da fertilidade masculina ou feminina (RIBEIRO; BEÇAK, 1984; EPA, 1996).

Nos ensaios de dominância letal, é relevante a avaliação das taxas reprodutivas, cujos parâmetros proporcionam em conjunto um excelente indicador da interferência de diferentes substâncias químicas sobre a reprodução, podendo inclusive identificar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos ocorreram (OSWEILLER, 98; CASTRO; MELLO; MELLO, 2005).

O índice de acasalamento correlaciona o número de fêmeas prenhas (que acasalaram e levarem a prenhez a termo) com o número de fêmeas acasaladas (que apresentaram esfregaço vaginal positivo para a presença de espermatozoides) (EPA, 1996). Não foram encontradas diferenças significativas no índice de acasalamento das fêmeas com machos tratados com o EHA-PH, sugerindo que o tratamento não induziu à diminuição ou perda da libido e, dessa forma, não alterou o comportamento sexual masculino, sendo este dado evidenciado pela presença de espermatozoides nos esfregaços vaginais das fêmeas acasaladas, pela presença de tampão copulatório e pelo número de fêmeas inseminadas e com implantes, que não diminuíram devido ao tratamento dos machos. Entretanto, de acordo com Amann (1982), em ratos, só há redução nas taxas de acasalamento quando ocorre um decréscimo superior a 60% na produção de espermatozoides normais, sugerindo então que essas taxas reprodutivas não constituem variáveis seguras para a avaliação da fertilidade nesses animais.

A exposição masculina a um determinado agente tóxico pode ser suficiente para produzir efeitos nocivos em seus descendentes (DAVIS et al., 1992; COLIE, 1993; SAVITZ et al., 1994). A passagem de toxicantes do pai para a mãe pode ocorrer através da transferência seminal e a exposição dos machos, antes da concepção, pode resultar em infertilidade, perdas pré e pós-implantação, morte embrionária, anomalias não específicas, bem como redução do peso ao nascer, diminuição do tamanho da ninhada e retardo do desenvolvimento pós-natal (QIU et al., 1995; COLIE, 1993; DELCLOS et al., 2001).

A implantação é o processo pelo qual o embrião alcança o contato físico e fisiológico íntimo com o endométrio materno para o estabelecimento da gestação. Durante esse processo ocorrem interações entre o blastocisto ativado e

o epitélio uterino para iniciar a implantação (PARIA et al., 2000). O tempo e integridade do transporte dos gametas e zigoto, importantes para a fertilização e sobrevivência embrionária, são bastante suscetíveis a alterações causadas por compostos químicos, que contribui para a redução na taxa de fertilização e aumento da perda embrionária precoce que são identificados como perdas pré-implantação (EPA, 1996).

O índice de implantação correlaciona-se com o número de corpos lúteos, sendo considerado um indicador do sucesso da implantação do blastocisto no endométrio (FORD, 1982; BORGES, 2005). Contrastando com o índice de implantação, a presença de reabsorções indica uma falha no desenvolvimento embrionário, e as perdas pós-implantação representam o prejuízo reprodutivo total provocado no período de prenhez (MÜLLER, 2007).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas no número de corpos lúteos, implantações, reabsorções e no índice de gestação de ratas acasaladas com ratos expostos ao EHA-PH. No entanto, a exposição ao EHA-PH provocou um aumento significativo nos índices de perdas pré-implantação e pós-implantação e uma redução nos índices de implantação das ratas acasaladas com ratos que receberam 6,1 mg/kg e 30,5 mg/kg do EHA-PH. Estes resultados indicam que o EHA-PH pode comprometer a fertilidade de ratos Wistar, sugerindo a possibilidade da ocorrência de efeitos mutagênicos nesses animais.

A avaliação de teratogenicidade em ratos expostos no período de organogênese, e provenientes de progenitores machos ou fêmeas expostos durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento e gestação, relaciona-se ao fato de que os gametas podem ter sofrido alterações antes da fertilização, com a manifestação dos efeitos ocorrendo em fases posteriores. Outros fatores que também alteram o processo reprodutivo incluem as modificações nas concentrações hormonais que podem interferir na manutenção e no desenvolvimento gestacional, afetando diretamente o desenvolvimento sexual ou geral e a viabilidade dos embriões e fetos (MACLUSKY; NAFTOLIN, 1981; KELLY, 1991).

Nesse estudo, anormalidades morfológicas foram observadas em dois fetos dos três natimortos descendentes de progenitoras acasaladas com

ratos expostos à dose de 30 mg/kg do EHA-PH. O número exato de filhotes observados com anormalidades estruturais assim como o número de natimortos pode ser menor do que o número real devido ao possível canibalismo das progenitoras. Também foi observado a presença de hérnia umbilical em um descendente proveniente de uma progenitora acasalada com rato exposto à dose de 30 mg/kg. Müller (2007) demonstrou que a administração do extrato aquoso de *Morinda citrifolia* L. causou anormalidades morfológicas em fetos natimortos descendentes de ratas Wistar expostas às doses de 7,5 e 750 mg/kg do extrato. Foi evidenciado a presença de quatro fetos não desenvolvidos, de pequenas dimensões, provenientes de duas progenitoras expostas à dose de 750 mg/kg e dois fetos não desenvolvidos de uma progenitora exposta à dose de 7,5 mg/kg. Também evidenciou-se a presença de hérnia umbilical em três descendentes fêmeas provenientes de duas progenitoras expostas à dose de 75 mg/kg e uma progenitora exposta à dose de 7,5 mg/kg do extrato. De acordo com a *Environmental Protection Agency* (1991), anormalidades estruturais podem ser indicativas de toxicidade de desenvolvimento, portanto as anormalidades morfológicas evidenciadas nesse estudo, em animais provenientes de ratas acasaladas com pais expostos ao EHA-PH, são relevantes e indicam toxicidade de desenvolvimento, porém é necessária a realização de ensaios específicos para malformações fetais para uma avaliação mais precisa dos efeitos teratogênicos.

O índice de nascimento reflete a relação entre o número de filhotes nascidos vivos e o número total de filhotes nascidos. A exposição de ratos ao EHA-PH nas diferentes doses testadas não interferiu nesse parâmetro em relação às fêmeas acasaladas com esses animais, provavelmente devido aos maiores prejuízos terem ocorrido nos processos de pré e pós-implantação. Nesse estudo, evidenciou-se decréscimo no índice de desmame para as ratas acasaladas com ratos expostos à dose intermediária do extrato (6,1 mg/kg), e isso pode ser atribuído à ocorrência de mortes de filhotes evidenciadas durante o período de lactação. A lactação é uma fase fundamental para o adequado crescimento e sobrevivência dos neonatos, por ser a única fonte de nutrição, no período inicial de vida, na maioria dos mamíferos (TUCKER et al., 1994). Dessa forma, considerando-se que essas fêmeas tiveram o maior número de filhotes nascidos

vivos (n=139), esse fato pode ter gerado dificuldade na amamentação da prole, reduzindo assim o número de filhotes vivos no desmame.

Nesse estudo, os filhotes foram analisados quanto ao desenvolvimento geral, comportamental e reflexológico. As variáveis de desenvolvimento físico incluíram: peso corporal, abertura dos olhos, desdobramento das orelhas, aparecimento de lanugo e pelos, erupção dos incisivos superiores, a abertura vaginal ou descida dos testículos.

Durante a gestação, o peso das ninhadas pode ser influenciado por fatores como capacidade intra-uterina, pelo tamanho da ninhada e pela duração da gestação. Após o nascimento, além da habilidade da fêmea, o efeito de substâncias químicas pode comprometer o desenvolvimento geral da prole (MELLO, 2001). Nesse estudo, observou-se que no 21º dia pós natal houve uma redução significativa no peso da prole de ratas acasaladas com ratos tratados nas doses de 6,1 mg/kg e 30,5 mg/kg. Entretanto, essa interferência sobre o ganho de peso dos filhotes em desenvolvimento pode ser explicada, em parte, pela quantidade de filhotes nesses grupos, o que pode ter favorecido a concorrência pela amamentação, reduzindo a oferta de leite a cada cria. Este fato pode ter repercutido em um menor ganho de peso corpóreo, além da ocorrência de fatores relacionados às condições fisiológicas e ambientais que também são capazes de alterar a ejeção do leite. É relevante considerar que, até o $8^{\circ} \pm 2$ dias pós-natal, a progênie alimenta-se exclusivamente de leite materno, e só após este período consegue se alimentar também de ração (MÜLLER, 2007).

Apesar dos resultados da prenhez indicarem toxicidade do EH-APH no desenvolvimento pré-natal, não foram evidenciados efeitos adversos sobre a maioria dos parâmetros de desenvolvimento geral dos descendentes (massa ao nascimento, período para o descolamento dos pavilhões auriculares, abertura dos olhos, aparecimento de lanugo e pelos, erupção dos incisivos e índice de viabilidade até o 4º dia pós-natal) dos grupos tratados quando comparados com o grupo controle. O tempo médio para a abertura do canal vaginal e para a descida bilateral dos testículos até a bolsa escrotal são eventos hormônio-dependente, portanto a ocorrência de alterações sobre a produção hormonal pode repercutir no aparecimento dessas características sexuais (MABLY et al., 1992). Nos resultados obtidos não foi encontrada nenhuma mudança significativa no tempo

de aparecimento desses parâmetros entre os grupos controle e tratados, indicando que o EHA-PH não interferiu no desenvolvimento sexual da prole. O conjunto de resultados obtidos sugere ausência de toxicidade paterna no desenvolvimento pós-natal, pois os descendentes dos grupos tratados, vivos até o 4º dia pós-natal, desenvolveram-se normalmente e apresentaram viabilidade de 100% quando comparados com o grupo controle.

O padrão de maturação dos reflexos, “produto de uma estimulação pré-estabelecida e precisa” (SMART; DOBBING, 1971), pode demonstrar uma adequada maturação do sistema nervoso central durante o desenvolvimento de um animal. Um retardo na maturação dos reflexos pode causar alterações nos processos sequenciais de desenvolvimento da atividade locomotora, como por exemplo, o comprometimento da marcha (BROWN; POLLIT, 1996).

Estudos realizados com o flavonoide ipriflavona, administrado a ratas Wistar durante a lactação, mostraram que a prole não apresentou retardo no seu desenvolvimento físico e reflexológico (SANTOS, 2011). Em contraste, Barros (2006) demonstrou retardo na maturação de reflexos de neonatos, incluindo geotaxia negativa e reflexo de endireitamento, causado por desnutrição imposta às progenitoras no período de lactação. Nesse estudo, os reflexos avaliados (andar adulto, geotaxia negativa e reflexo de endireitamento) nos descendentes de ratos tratados com o EHA-PH não divergiram em relação ao grupo controle, sugerindo que a exposição paterna às diferentes doses do extrato não causou retardo na maturação física e no desenvolvimento dos filhotes.

O teste do campo aberto é bastante utilizado para avaliação da capacidade exploratória e do grau de emocionalidade de animais de laboratório. A ambulação e o comportamento de levantar são atividades que refletem, principalmente, uma boa coordenação motora, enquanto o comportamento de limpeza e a defecação estão mais associados ao estado emocional do animal (CARLINI, 1979; BUENO et al., 1984, QUINTANS-JÚNIOR et al., 2004). Estudos realizados por Costa-Silva e colaboradores (2006) mostraram que a administração do óleo de *Carapa guianensis* a ratas prenhas causou alterações no parâmetro de ambulação espontânea da prole, evidenciada por um aumento significativo da atividade motora, sugerindo uma possível ação central desse extrato. A administração do EHA-PH a ratos não induziu alterações significativas

na ambulação, comportamento de levantar, limpeza e defecação da prole, sugerindo que o EHA-PH não alterou o grau de ansiedade e emocionalidade dos descendentes dos ratos tratados.

Considerando os resultados obtidos na presente pesquisa para a avaliação do potencial tóxico do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*, foram evidenciadas algumas alterações nos parâmetros avaliados, sugerindo a possibilidade de efeitos tóxicos sistêmico, mutagênicos e no desenvolvimento fetal no modelo experimental estudado. Porém, não foi observado comprometimento de órgãos vitais nem tampouco de órgãos do sistema reprodutor masculino, o que sugere que essa espécie vegetal, de um modo geral, não apresenta toxicidade sobre os sistemas e órgãos analisados. Porém, há a necessidade de realização de estudos complementares, como a avaliação da concentração de testosterona plasmática, exames anatomopatológicos e ensaios de teratogenicidade, para uma melhor interpretação desses resultados.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que, sob as condições experimentais utilizadas, o extrato hidroalcoólico de *P. huberi* administrado a ratos Wistar:

- ✓ Interfere na evolução ponderal, sugerindo a ocorrência de efeito tóxico sistêmico;
- ✓ Não induz efeito tóxico direto sobre órgãos vitais e reprodutores;
- ✓ Não interfere com a integridade funcional dos testículos, epidídimo, vesícula seminal e próstata;
- ✓ Não compromete a produção e a qualidade dos espermatozoides;
- ✓ Não interfere com o acasalamento;
- ✓ Interfere no desenvolvimento pré-natal, sugerindo a ocorrência de efeitos tóxicos mutagênicos e no desenvolvimento fetal;
- ✓ Não interfere sobre o desenvolvimento geral e comportamental da prole;
- ✓ Não afeta o padrão de maturação de reflexos da prole;

Dessa forma, os efeitos adversos observados em ratos Wistar pela administração do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* indicam que esse extrato pode provocar efeito tóxico sistêmico, mutagênico e no desenvolvimento fetal. Entretanto, é necessário que outras pesquisas sejam realizadas para a caracterização do risco toxicológico do uso desse extrato sobre o sistema reprodutor.

Referências

REFERÊNCIAS

AIRES, M. M., **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

AKBARSHA, M. A.; MURUGAIAN, P. Aspects of the male reproductive toxicity/male antifertility property of andrographolide in albino rats: effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 432-435, 2000.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 209-217, 2002.

ALMEIDA, E. R.; MELO, A. M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and Boldine in rats. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 99-102, 2000.

AL-YAHYA, A. A.; AL-MAJED, A. A.; AL-BEKAIRI, A. M.; AL-SHABANAH, O. A.; QURESHI, S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo Biloba* in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 222-228, 2006.

AMANN, R. P.; HAY, S. R.; HAMMERSTEDT, R. H. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 723-733, 1982.

APG. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

ARENA, A. C. **PARÂMETROS REPRODUTIVOS MASCULINOS E FERTILIDADE DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS AO INCETICIDA FENVALERATO**. 2006. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

AWONIYI, C. A.; SANTULLI, R.; SPRANDO, R. L.; EWING, L. L.; ZIRKIN, B. R. Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. **Endocrinology**, v.124, p.1217-23, 1989.

BANZATO, T. P. **AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS E ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TESTÍCULO DE RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO IN UTERO E DURANTE A LACTAÇÃO**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba.

BARROS, K. M. F. T. **DESNUTRIÇÃO NEONATAL: ASPECTOS ESTRUTURAIS E BIOMECÂNICOS DO DESENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS**. 2006. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 57-67.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989, p. 285.

BAWA, S. The significance of soy protein and soy bioactive compounds in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. **Journal of Osteoporosis**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

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

BITRAN, D.; HULL, E. M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 11, n. 4, p. 365-89, 1987.

BLAZAK, W. F.; ERNST, T. L.; STEWART, B. E. Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats. **Fundamental Applied Toxicology**, v. 5, p. 1097-1103, 1985.

BORGES, L. V.; DO CARMO, J. C.; PETERS, V. M.; LAS CASAS, L.; GUERRA, M. O. A. Toxicidade do *Hypericum perforatum* administrado a ratas prenhes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 206-208, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/legis.htm>. Acesso em: 14 jan. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. 2006. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 19 mar. 2011.

BRASIL. Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. Anexo I: Normas para estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116_96.htm. Acesso em: 19 fev. 2011.

BROOKS, D. E. Epididymal functions and their hormonal regulation. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 36, p. 205-221, 1983.

BROWN, L.; POLLIT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientific American**, v. 274, n. 2, p. 38-43, 1996.

BUENO, O. F. A.; CARLINI, E. A.; LEITE, J. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; SOUZA, M. L. O.; TUFIK, S. Estudos pré-clínicos com mianserina - efeitos agudos e crônicos em ratos e camundongos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 33, p. 266-78, 1984.

BÚFALO, A. C. **ANTIDEPRESSIVO *Hypericum perforatum* L. SOBRE O SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO DE RATOS WISTAR. 2007.** Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical & Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CANTARUTTI, T. F. P. 2005. **RISCO TÓXICO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS E TOXICIDADE REPRODUTIVA EM RATOS WISTAR.** Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARLINI E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENDGARDEN, M. L.; BUENO, O. F. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p.37-64. 1986.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

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

CAVALCANTE, J. C.; SITA, L. V.; MASCARO, M. B.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Distribution of Urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. **Brain Research**, v. 1089, p. 116-125, 2006.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; PÓVOA, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

CLEGG, E. D.; PERREAULT, S. D.; KLINEFELTER, G. R. Assessment of male reproductive toxicity. In: HAYES, A. W. (Ed.). **Principles and Methods of Toxicology**. 4 ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001, p. 1263-1300.

COAKLEY F.; HRICAK, H. Radiologic anatomy of the prostate gland: a clinical approach. **Radiologic Clinic North America**, v. 38, p. 13-30, 2000.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para Técnicos em Bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H. A. Rothchild, 1996, p. 259.

COLIE, C. F. Male mediated teratogenesis. **Reproductive Toxicology**, v. 7, p. 3-9, 1993.

COOPER, R. L. Current developments in reproductive toxicity testing of pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 180-187, 2009.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, v. 5, p. 400, 1986.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAÚJO, A. V.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A. C.; FRAGA, M. C. C. A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, p. 25, n. 3, p. 425-428, 2006.

CUASNICÚ, P. S.; COHEN, D. J.; ELLERMAN, D. A.; BUSO, D.; DA ROS, V. G.; MORGENFELD, M. M. Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds.). **The Epididymis – from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 2002, p. 389-403.

DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. (Eds.). **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses. Cap. 13, p. 227 – 255, 1993.

DALLEGRAVE, E. **TOXICIDADE REPRODUTIVA DO HERBICIDA GLIFOSATO-ROUNDUP® EM RATOS WISTAR**. 2003. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 45-52, 2003.

DALSENTER, P. R.; DALLEGRAVE, E.; MELLO, J. R.; LANGELOH, A.; OLIVEIRA, R. T.; FAQI, A. S. Reproductive effects of endossulfam on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 18, n. 9, p. 583-589, 1999.

DALSENTER, P. R.; FAQI, A. S.; WEBB, J.; MERKER, H. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. **Human and Experimental Toxicology**, v. 16, p.146-153, 1997.

DAS, S.; PARVEEN, S.; KUNDRA, C. P; PEREIRA, B. M. Reproduction in male rats is vulnerable to treatment with flavonoid-rich seed extracts of *Vitex negundo*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 1, p. 8-13, 2004.

DAVIS, D.L.; MATTISON, D.; MORRIS, R. Male-mediated teratogenesis and other reproductive effects: biologic and epidemiologic findings and a plea for clinical research. **Reproductive Toxicology**, v. 6, p. 289-292, 1992.

DELCLOS, K. B.; BUCCI, T. J.; LOMAX, L. G.; LATENDRESSE, J. R.; WARBRITTON, A.; WEIS, C. C.; NEWBOLD, R. R. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague Dawley) rats. **Reproductive Toxicology**, v.15, p. 647-663, 2001.

DESCAT, F. **Hematologie du rat: hemogramme et myelogramme**. 2002. Tese d'exercice. Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, France.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIMECH, G. S.; GONÇALVES, E. S.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispera* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 152-157, 2006.

DUARTE, J. A. R.; APPELL, H. J.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. L.; SOARES, J. M. C. Endothelium derived oxidative stress may contribute to exercise induced muscle damage. **International Journal of Sports Medicine**, v. 14, p. 440-443, 1993.

EPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. EPA/630/R-96/009-Guidelines for Reproductive Toxicity Risk. Disponível em: <<http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/REPRO51.PDF>>. Acesso em 20 de set. de 2011.

ESPERANÇA PINA, J. A. **Anatomia Humana dos Órgãos**. Lisboa: Lidel, 2004.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 4. ed. Porto Alegre: Artemed, 2003, p. 298.

FDA - U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA-2001. Reviewer Guidance. Integration of study results to assess concerns about human reproductive and developmental toxicities. Disponível em: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/992079gd.pdf>>. Acesso em 19 de set. de 2011.

FARIA, D. E. P.; BORGES, L. V.; PETERS, V. M.; REIS, J. E. P.; RIBEIRO, L. C.; SÂ, R. C. S.; GUERRA, M. O. Postnatal development of pups from nursing rats treated with *Ginkgo biloba*. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 2, p.185-189. 2008.

FERNANDEZ, C. D. B. **ALTERAÇÃO DO TEMPO DE TRÂNSITO EPIDIDIMÁRIO: IMPLICAÇÕES NO PERFIL PROTEICO E OUTROS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**. 2006. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FERNANDEZ, C. D. B.; PORTO, E. M.; ARENA, A. C.; KEMPINAS, W. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 427-437, 2007.

FERREIRA, D.; MEDEIROS, S. F. Influência dos fatores sócio ambientais sobre a qualidade do sêmen. **Reprodução & Climatério**, v. 15, n. 3, p. 128-132, 2000.

FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. **Dermatology in General Medicine**, 4th ed. New York: McGraw-Hil, cap. 16, p. 241-253, 1993.

FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anesthesia**. New York: Academic Press, p. 160-182, 1996.

FOOTE, R. H., SCHERMERHORN, E. C., SIMKIN, M. E. Measurement of semen quality, fertility, and reproductive hormones to assess dibromochloropropane (DBCP) effects in live rabbits. **Fundamental & Applied Toxicology**, v. 6, p. 628-637, 1986.

FORD, W. C. L. The effect of deoxy-6-fluoroglucose on the fertility of male rats and mice. **Contraception**, v. 25, p. 535-545, 1982.

GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECRUYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 321-339, 2004.

GLEICH, J.; FROHBERG, H. General teratological techniques. In: NEUBERT, D.; MERKER, H. J.; KWASIGROCH, T. E. (Eds.). **Methods in Prenatal Toxicology**. Evaluation of embryotoxic effects in experimental animal. Massachusetts: PSG Publishing Co., 1977, p. 94-102.

GLOVER, T. D. The epididymis. In: CHISHOLM, G. D.; WILLIAMS, D. I. (Eds.). **Scientific Foundations of Urology**. London: William Heinemann Medical Books Ltd, p. 544-555, 1982.

GUDE, W. D.; COSGROVE, G. E.; HIRSCH, G. P. **Histological Atlas of the Laboratory Mouse**. New York: Plenum Press, 1982, p. 70- 79.

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

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HALPERN, M.; MARTÍNEZ-MARCOS, A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 245-318, 2003.

HAMILTON, D. W.; COOPER, T. G. Gross and histological variations along the length of the rat vas deferens. **The Anatomical Record**, v. 190, p. 795-810, 1978.

HARAGUCHI, H.; MOCHIDA, Y.; SAKAI, S.; MASUDA, H.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; CHOU, W. H. Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 60, p. 945-948, 1996 .

HARDING, S. M.; MCGINNIS, M. Y. Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN: effects on male sociosexual behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 4, p. 671-80, 2004.

HAYWARD, S. W.; BASKIN, L. S.; HAUGHNEY, P. C.; CUNHA, A. R.; FOSTER, B. A.; DAHIYA, R.; PRINS, G. S.; CUNHA, G. R. Epithelial developmental in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 155, p. 81-93, 1996.

HAYWARD, S. W.; BASKIN, L. S.; HAUGHNEY, P. C.; FOSTER, B.A.; CUNHA, A. R.; DAHIYA, R.; PRINS, G. S.; CUNHA, G. R. Stromal developmental in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 155, p. 94-103, 1996.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. V. Anatomy and embriology of the laboratory rat. **BioMed Verlag**, p. 270, 1986.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds). **The Epididymis – from Molecules to Clinical Practice**. New York : Kluwer Academic/Plenum. Press, 2002, p. 81-102.

HERRERA, M. G.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; MARHUENDA, E. ; DUARTE, J. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. **General Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 273-277, 1996.

HERTOG, M. G.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutrition & Cancer**, v. 20, n.1, p. 21-29, 1993.

HESS, R. A. Spermatogenesis, overview. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Eds.). **Encyclopedia of Reproduction**. New York: Academic Press, 1999, v. 4, p. 539–545.

HOLLENBACH, C. B. **ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE DUAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS COMERCIAIS CONTENDO SOJA [*Glycine max* (L.) Merr] EM RATOS WISTAR**. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HOLLENBACH, C. B.; BORTOLINI, C. E.; BATISTA, J. M.; HOLLENBACH, E. B.; SCHUC, T. L.; PACHECO, M. H.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. Desenvolvimento pós-natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar no estudo de toxicidade reprodutiva de duas preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max* (L.) Merr. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , v. 62, n. 4, p. 845-852, 2010.

HULEIHEL, M.; LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, n. 3, p. 259-268, 2004.

ISAACS, J. T. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. **The Prostate**, v. 5, p. 545-557, 1984.

JACQUEMIN, H.; BOISSONAT, A.; FAUGERAS, G.; TILLEQUIN, F.; DELAVEAU, P. Flavonoides de *Glycoxylon huberi* Ducke. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 43, n. 5, p. 521-525, 1985.

JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. **Reproductive Toxicology**, v. 11, p. 171-178, 1997.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 407.

JAMES, W. P. T.; HAY, A. M. Albumin metabolism: effect of the nutritional state and the dietary protein intake. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, p. 1958-1972, 1968.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P. T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals**. 4 th ed. San Diego: Academic Press, 1991, p. 173-219.

JONES, R. C. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 57-67, 1999.

KANBARA, T.; MIZUTANI, K.; TAMURA, K.; KATAOKA, S. Extraction of astilbins from *Engelhardtia chrysolepis* leaves and their anti-inflammatory activities. **Japanese Kokai Tokkyo Koho**, v. 6, p. 256-294, 1994.

KATO, H.; MORISHIGE, W. K.; ROTCHILD, I. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteum activity in pregnant rat. **Endocrinology**, v. 105, p. 846-50, 1979.

KELLY, D. D. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (Eds.). **Principles of Neural Science**. 3. ed. Connecticut: Prentice-Hall International Inc., 1991, p. 959-973.

KIMMEL, G. L.; CLEGG, E. D.; CRISP, T. M. Reproductive toxicity testing: A risk assessment perspective. In: WITORSCH, R. J. (Ed.). **Reproductive Toxicology**. New York: Raven Press, 1995. p. 75-98.

KLINFELTER, G. R. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds.). **The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 2002, p. 353-369.

KOHN, D. F.; WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; BENSON, G. J. **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. New York: Academic Press, 1997.

KU, W. W.; CHAPIN, R. E.; WINE, R. N.; GLADEN, B. C. Testicular toxicity of boric acid (BA): relationship of dose to lesion development and recovery in the F344 rat. **Reproductive Toxicology**, v. 7, p. 305-319, 1993.

KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, M. A.; VIANA, E.; COELHO-FERREIRA, M.; BRITO A. R. M. S. Gastroprotective activity of *Pradosia huberi* on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulphhydryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 61-67, 2005.

LANGELOH, A.; MELLO, J. R. Plantas tóxicas. In: MAGALHÃES, H. M. (Ed.). **Farmacologia veterinária: Temas Escolhidos**. Guaíba: Agropecuária, 1998, p. 17-36.

LEE, C.; SENSIBAR, J. A.; DUDEK, S. M.; HIIPAKKA, S.; LIAO, S. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morfological and functional activities. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 1079-1986, 1990.

LEMÔNICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M.T.V.; SCHÜLER-FACCINI. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/ UFRGS, 2001, p. 19-39.

LEMONICA, I. P.; DAMASCENO, D. C.; DI-STASI, L. C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Brazilian Journal of Medical & Biological Research**, v. 29, n. 2, p. 223-227, 1996.

LEVIN, R.; RILEY, A. The physiology of human sexual function. **Psychiatry**, v. 6, n. 3, p. 90-94, 2007.

LOEB, W. F. Clinical biochemistry of laboratory rodents and rabbits. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

MABLY, T. A., MOORE, R. W., PETERSON, R. E. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 114, p. 97-107, 1992.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; MARTINS, J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LAPA, A. J.; VANDERLINDE, F. A. *Croton cajucara* as an alternative to traditional medicine in a modern health system. In: Recent Progress in Medicinal Plants. **Phytochemistry & Pharmacology**, v. 8, p. 459-475, 2002.

MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v. 211, n. 20, p. 1294-1303, 1981.

MACRIDES, F.; BARTKE, A.; DALTERIO, S. Strange females increase plasma testosterone levels in male mice. **Science**, v. 189, n. 4208, p. 1104-1106, 1975.

MAHONY, M. C.; HODGEN, G. D. Toxic effects on the hypothalamus-anterior pituitary-gonadal axis, control on the male and female reproductive system, and related issues. In: WITORSCH, R. J. (Ed.). **Reproductive Toxicology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1995, p. 195-213.

MANI, U.; ISLAM, F.; PRASAD, A. K.; KUMAR, P.; SURESH KUMAR, V.; MAJI, B. K.; DUTTA, K. K. Steroidogenic alterations in testes and sera of rats exposed to formulated fenvalerate by inhalation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 21, n. 11, p. 593-597, 2002.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 37, p. 179-188, 1974.

- MARKER, P. C.; DONJACOUR, A. A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G. R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, p. 165-174, 2003.
- MARTINEZ, F. E.; MARTINEZ, M.; GARCIA, P. J.; CAGNON, V. H.; GRALHOZ, G.; SANTOS, C. X. C. Morfologia da vesícula seminal de chinchila (*Chinchila laniger*). **Revista de Ciências Biomedéicas**, v. 16, p. 17-23, 1995.
- MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E.; GARCIA, P. J.; PADOVANI, C. R.; CAGNON, V. H. A. Estudo morfológico da próstata e vesículas seminais de rato (*Rattus norvegicus*) durante o desenvolvimento pós-natal. **Salusvita**, v. 11, n. 1, p. 39-50, 1992.
- MARTY, M. S.; CHAPIN, R. E.; PARKS, L. G.; THORSRUD, B. A. Development and maturation of the male reproductive system. Birth defects research. Part B. **Developmental & Reproductive Toxicology**, v. 68, p. 125-136, 2003.
- MCDONALD, L. E.; PINEDA, M. H. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989.
- McLACHLAN, R. I.; WREFORD, N. G.; CON TSONIS, C.; KRETSER, D. M.; ROBERTSON, D. M. Testosterone effects on spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized rat. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 271-280, 1994.
- MEANS, A. R. Mechanisms of gonadotrophic hormone action in the testis. In: SPILMAN, C. H.; LOBL, T. J.; KIRTON, K. T. (Eds.). **Regulatory mechanisms of male reproductive physiology**. Amsterdam: Excerpta Medica, 1976, p. 87-95.
- MEDEIROS, F. A.; MEDEIROS, A. A. N.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. S. Flavononóis acetilados de *Pradosia huberi* Ducke (Sapotaceae). In: 29ª Reunião Anual da **Sociedade Brasileira de Química**, 2006.
- MEDEIROS, A. A. N. **ESTUDO DA ATIVIDADE DAS ESPÉCIES AMAZÔNICAS: *Pradosia huberi* Ducke. e *Attalea excelsa* Mart. SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS**. 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 2001. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MELLO, J. R. B.; MAIA, J. Z.; CASTRO, A. P.; MELLO, F. B. Avaliação dos efeitos do *Pygeum africanum* rosaceae sobre a fertilidade de ratos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p.103-110, 2004.

MENEZES, D. J. A.; CARVALHO, M. A. M.; ASSIS-NETO, A. C.; OLIVEIRA, M. F.; FARIAS, E. C.; MIGLINO, M. A.; MEDEIROS, G. X. Morphology of the external male genital organs of agouti (*Dasyprocta aguti*. Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 148-153, 2003. Suplemento 2.

MESSIAS, J. B.; CARACIOLO, M. C. M.; OLIVEIRA, I. M.; MONTARROYOS, U. R.; GUERRA, M. O.; SOUZA, I. A. Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado. **Medicina Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2009.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, n. 2, p. 171-175, 2002.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia Orientada para a Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MORAES, G. E. S. **Espemocitograma**. Porto Alegre: Médica Missau, 1994. cap. 2, p. 61-93.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea ducket* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 57-61, 1998.

MOUNDIPA, F. P.; KAMTCHOUING, P.; KOUETA, N.; TANTCHOU, J.; FOYANG, N. P. R.; MBIAPO, F. T. Effects of aqueous extracts of *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* in mature rat testis function. **Journal Ethnopharmacology**, v. 65, p. 133-139, 1999.

MULDOON, F. M.; KRITCHEVSKY, S. B. Flavonoids and heart disease: evidence of benefit still fragmentary. **British Medical Journal**, v. 312, p. 458-459, 1996.

MÜLLER, J. C. **TOXICIDADE REPRODUTIVA DA *Morinda citrifolia* Linn.** 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NESTOR, A.; HANDEL, M. A. The transport of morphologically abnormal sperm in the female reproductive tract. **Gamete Research**, v. 10, p. 119-126, 1984.

NETT, T. M. Reproductive endocrine function testing in stallions. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993, p. 821-824.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre-or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrinology Chemical Environmental**, v. 3, p. 24-52, 1995.

NEUBERT, D.; MERKER, H. J.; KWASIGROCH, T. E. **Methods in Prenatal Toxicology**. Massachussetts: PSG Publishing Company, 1977, p. 94-102.

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

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development, 1995. OECD-Guideline 421: **Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test**. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL421.pdf. Acesso em 19 de Outubro de 2011.

OLIVEIRA, A. A. V. **EFEITO DO CONSUMO DO TABACO NA FERTILIDADE MASCULINA**. 2010. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde. Universidade da Beira Interior, Covilhã.

OLIVEIRA, E. C. **AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA NUTRICIONAL DE ANIMAIS TREINADOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO E RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL**. 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

OLSON, G. E.; NAGDAS, S. K.; WINFREY, V. P. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds.). **The Epididymis: from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002, p. 371-387.

ORGBIN-CRIST, M. C. Studies on the function of the epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 1, p.155-175, 1969.

ORGBIN-CRIST, M. C.; JAHAD, N. The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. **Endocrinology**, v. 103, n. 1, p. 46-53, 1978.

OSWEILLER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 526, 1998.

PAKRASHI, A.; RAY, H.; PAL, B. C.; MAHATO, S. B. Sperm immobilizing effect of triterpene saponins from *Acacia auriculiformis*. **Contraception**, v. 43, n. 5, p. 475-483, 1991.

PARIA, B. C.; LIM, H.; DAS, S. K.; REESE, J.; DEY, S. K. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. **Cell & Developmental Biology**, v. 11, p. 67-76, 2000.

PAUL, D.; MALLICK, C.; ALI, K. M.; NANDI, D. K.; GHOSH, D. Duration dependent effect of hydro-ethanolic extract of leaf of *S. hernandifolia* and root of *A. aspera* on testicular androgenic and gametogenic activity: An approach for male herbal contraceptive development. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 2, n. 4, p. 1-10, 2010.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; DE-CARVALHO, R. R.; SOUZA, C. A. M.; MADIL, K.; CHAHOUD, I. Study of the effects of β -myrcene on rat fertility and general reproductive performance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 955-965, 1997.

PENNINGTON, T. D. Sapotaceae (Sapodilla family). In: Smith, N.; Mori, S. A.; Henderson, A.; Stevenson, D. Wm.; Heald, S. V. (Eds.). **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2004, p. 342-344.

PENNINGTON, T. D. Sapotaceae. **Flora Neotropica Monograph**. New York: The New York Botanic Garden, v. 52, p. 1-770, 1990.

PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the brazilian medicinal plants. **Ciência e Cultura**, v. 49, p. 364-369, 1997.

PINTO, V. M.; ALLGAYER, M. C.; PEREIRA, R. A.; MELLO, J. R. B.; BREYER, A. S.; OLIVEIRA, M. E. M. Avaliação do uso de *Piper methysticum* quanto ao desenvolvimento de hepatotoxicidade em ratos Wistar. **Revista Veterinária em Foco**, v. 3, n. 1, p. 17-28, 2005.

QIU, J.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1465-1473, 1995.

QUIAN, S. Z. Gossypol - a potential antifertility agent for males. **Annual Review of Pharmacology & Toxicology**, v. 24, p. 329-360, 1984.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DUARTE, J. C.; TABOSA, I. M. Toxicidade aguda e alterações comportamentais induzidas pela fração de alcalóides totais das vagens de *Prosopis juliflora* (Sw) D. C. (Leguminosae) em roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 5-10, 2004.

RAJALAKSHMI, M. Compounds affecting motility and fertilizing ability of spermatozoa in the male. Advances in fertility regulation in the male. In: Symposium Organized by The Ministry of Public health of the People's Republic of China and The World Health Organization. **Proceedings**: Nanjing, p. 135-137, 1984.

REDI, C. A.; GARAGNA, S.; PELLICCIARI, C.; MANFREDI-ROMANINI, M. G.; APANNA, E.; WINKING, H.; GROPP, A. Spermatozoa of chromosomally heterozygous mice and their fate in male and female genital tracts. **Gamete Research**, v. 9, n. 3, p. 273-286, 1984.

REID, B. L.; CLELAND, K. W. The structure and function of the epididymis. The histology of the rat epididymis. **Australian Journal of Zoology**, v. 5, p. 223-246, 1957.

REVATHI, P.; VANI, B.; SARATHCHANDIRAN, I.; KADALMANI, B.; PRAKASH SHYAM K.; PALNIVEL, K. Reproductive toxicity of *Capparis aphylla* (Roth.) in male albino rats. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 3, p. 101-112, 2010.

RIBEIRO, L. R.; BEÇAK, W. Mutagenic studies on mammalian germ cells: methodological evaluation. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 2, p. 321-332, 1984.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The epididymis. In: NEILL, J. D (Ed). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. St Louis: Elsevier Academic Press, 2006, v. 1, p. 1071–1148.

ROCHA, A. O. B. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE *Pradosia huberi* DUCKE (DUCKE)**. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T. S.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.

RODRIGUEZ, J. A.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 877-917.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. Sistema genital masculino. In: ROSS, M. H (Ed.). **Histologia: texto e atlas**. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. cap. 21, p. 603-648.

ROY-BURMAN, P.; WU, H.; POWELL, W. C.; COHEN, M. B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, p. 225-254, 2004.

SÁ, R. C. S. **INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE *Mikania glomerata* Spreng. (ASTERACEAE) SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS WISTAR**. 2003. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SACHETTI, C. G. **AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA EM RATOS: ESTUDOS DE TOXIDADE AGUDA, NEUROTOXIDADE E EMBRIOFETOTOXIDADE**. 2010. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília.

SALADIN, K. S. The unit of form and function. In: **Anatomy and Physiology**. New York: McGraw-Hill, 2001.

SANTOS, T. R. **DESENVOLVIMENTO NEONATAL DE CRIAS DE RATAS WISTAR (*Rattus Norvegicus* BERKENHOUT, 1769) TRATADAS COM O FLAVONOIDE IPRIFLAVONA DURANTE A LACTAÇÃO PLENA.** 2011. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

SAVITZ, D. A.; SONNENFELD, N. L.; OLSHAN, A. F. Review of epidemiologic studies of paternal occupational exposure and spontaneous abortion. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 25, p. 361-383, 1994.

SEIGNEUR, M.; BONNET, J.; DORIAN, B.; BENCHIMOL, D.; DROUILLET, F.; GOUVERNEUR, G.; LARRUE, J.; CROCKETT, R.; BOISSEAU, M. R.; RIBEREAU-GAYON, P.; BRICAUD, H. Effect of the consumption of alcohol, white wine, and red wine on platelet function and serum lipids. **Journal of Applied Cardiology**, v. 5, p. 215-222, 1990.

SETCHELL, B. P. Innervation and vasculature of the excurrent duct system. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds.). **The Epididymis – from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 2002, p. 35-48.

SETCHELL, B. P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D. E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 18, p. 1063-1175.

SHARMA, A. K.; KAPADIA, A. G.; FRANSIS, P.; RAO, M. V. Reversible effects of mercuric chloride on reproductive organs of the male mouse. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 2, p. 153-159, 1996.

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

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam. **Embrapa – CNPGC**, 1993. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc51/03avaliacaocapacidade.html>>. Acesso em: 4 out. 2011.

SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVES, E. S.; SOUSA, I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M. C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; ALMIR, G.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

SILVA, V. C. L. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À INGESTÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss)**. 2010. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVEIRA, J. M. Bioquímica Clínica. **Patologia clínica veterinária: teoria e interpretação**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

SIMONS, R. G.; GRINWICH D. L. Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 288-296, 1989.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research**, v. 28, p. 85-95, 1971.

SOKOL, R. Z. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. In: SIPES, G.; MCQUEEN, C. A.; GANDOLFI, A. J. (Eds.). **Comprehensive Toxicology**. Cambridge: Cambridge university Press, 1997, p. 87-98.

SOMKUTI, S.; LAPADULA, D. M.; CHAPIN, R. E.; LAMB IV, J. C.; ABOU-DONIA, M. B. Reproductive tract lesions resulting from subchronic administration (63 Days) of tri-o-cresyl phosphate in male rats. **Toxicology & Applied Pharmacology**, v. 89, p. 49-63, 1987.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 21-27, 1991.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Processos reprodutivos da fêmea. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 36, p. 615-644.

STEVENS, P. F. 2001. Angiosperm phylogeny website. Disponível em: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>. Acesso em: 20 set. 2011.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells Molecules & Diseases**, v. 35, p. 1-10, 2005.

SWENSON, M. J. Propriedades fisiológicas e constituintes celulares e químicos do sangue. In: SWENSON, M. J. (Ed.). **Fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p. 13-25.

TEIXEIRA, L. T. A.; SILVEIRA JÚNIOR, L. S.; QUEIROZ, F. M.; OLIVEIRA, C. N.; SCHWARZ, A. Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* e da *Piper methysticum* em ratos. **Brazilian Journal of Toxicology**, v. 22, n. 1-2, p. 42-49, 2009.

THAKUR, S. C.; THAKUR, S. S.; CHAUBE, S. K.; SINGH, S. P. Subchronic supplementation of lithium carbonate induces reproductive system toxicity in male rat. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 6, p. 683-690, 2003.

TOMÉ, A. R. **ESTUDO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO CRÔNICA DO ÓXIDO NÍTRICO NA REPRODUÇÃO DE RATOS MACHOS**. 2002. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

TUCKER, H. A. Lactation and its hormonal control. In: KNOBIL, E; NEIL, J. **The Physiology of Reproduction**, cap. 57, p. 1065-1098, 1994.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 189-306, 2006.

VAN ROOSMALEN, M. G. M.; VAN ROOSMALEN, T.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B. Two new species of marmoset, genus *Callithrix Erxleben*, 1777 (Callitrichidae, Primates), from the Tapajós/Madeira interfluvium, south Central Amazonia, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 8, n. 1, p. 2-19, 2000.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILMANN, H.; VILMANN, A. The penis of the rat. II. Morphology of the mature bone. **Anatomischer Anzeiger**, v. 146, p. 483-493, 1979.

WILKINSON, P.; MENDENHALL, C. L. Serum albumin turnover in normal subjects and patients with cirrhosis measured by ¹³¹ iodine labelled human albumin. **Clinical Science**, v. 25, p. 281-292, 1963.

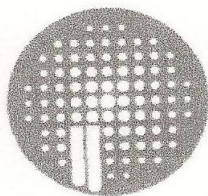
WRIGHT, W. W.; FRANKEL, A. L. Endogenous androgen concentration in nuclei isolated from seminiferous tubules of mature rat testis. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 10, p. 633-640, 1979.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk assessment approach. In: HAYES, W. (Ed.). **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press, p. 275-309, 1989.

ZENICK, H; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: HAYES, W. (Ed.). **Principles and Methods of Toxicology**. 3. ed. New York: Raven Press, cap. 27, p. 937-988, 1994.

ZIRKIN, B. R. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 417-421, 1998.

ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO**

João Pessoa, 29 de novembro de 2010

CEPA N°. 0409/10

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Orientando(a) : ELANE CRISTINA SILVA DOS SANTOS

Departamento/Setor: LTF

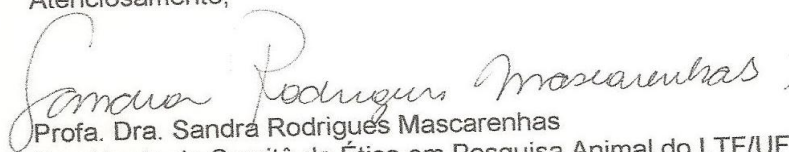
Ref.: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE Pradosia huberi Ducke SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E ÓRGÃOS VITAIS DE RATOS E SUA PROLE

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 216 ratos e ratas wistar

Período: 01/2011 até 12/2011

Atenciosamente,



Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB