

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

ELANE CRISTINA SILVA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Krameria tomentosa* A. St. HILL SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS E RATAS E SUAS PROLES

João Pessoa - PB

Junho - 2016

ELANE CRISTINA SILVA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Krameria tomentosa* A. St. HILL SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS E RATAS E SUAS PROLES

Tese 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 DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

CO-ORIENTADORA:

Profa. Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá

João Pessoa - PB

Junho - 2016

S237i Santos, Elane Cristina Silva dos.
Investigação do potencial tóxico do extrato etanólico de
Krameria tomentosa A. St. Hill sobre o sistema reprodutor de
ratos e ratas e suas proles / Elane Cristina Silva dos Santos.-
João Pessoa, 2016.
182f. : il.
Orientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Coorientadora: Rita de Cássia da Silveira e Sá
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Krameria tomentosa*. 3. Fertilidade.
4. Ratos - proles. 5. Toxicidade reprodutiva.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

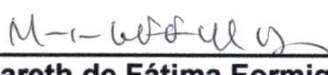
ELANE CRISTINA SILVA DOS SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Krameria tomentosa A. ST. HILL SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE
RATOS E RATAS E SUAS PROLES**

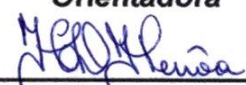
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA.

Aprovada em 20 / 06 / 2016

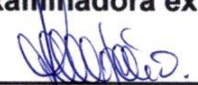
BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Hízeth de Luna Freire Pessoa
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa



Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo



Profa. Dra. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa



Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

Dedicatória

A Deus,
mestre dos mestres, pelo dom da vida, por renovar a cada dia a minha fé, pelo 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.

Às minhas amadas filhas,
Maria Antonella Landim Macêdo Silva e Sarah Valentine Silva Landim Macêdo, pela
oportunidade de conhecer e sentir a mais pura forma de amar.

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 e dedicação para a realização deste trabalho e por ter contribuído diretamente com o meu aprendizado científico.

Ao Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, pelo fornecimento do extrato etanólico de *Krameria tomentosa*, objeto de estudo neste trabalho.

À amiga Sara Alves, pela amizade e colaboração no fornecimento do extrato etanólico de *Krameria tomentosa*.

Às amigas Flávia Luana Santos, Priscylla Antunes, Nayara Oliveira e Kerollayne Jacob, 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 Vieira Sobral, 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 membros da banca de qualificação, os professores doutores Marianna Vieira Sobral, Hilzeth de Luna Freire Pêsoa e Reinaldo Nóbrega de Almeida, pela fundamental contribuição científica, imprescindível para o aprimoramento desse trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, pelo apoio prestado.

Às secretárias da pós-graduação, em especial a Caroline Medeiros Manguiera pelos serviços prestados.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, que contribuíram desde a limpeza até a segurança.

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

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

A todos os amigos de turma do doutorado 2012 e àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Elane Cristina Silva dos Santos

Resumo

RESUMO

Krameria tomentosa (carrapicho de cavalo ou ratainha-da-terra) é um arbusto utilizado na medicina popular por sua ação adstringente. Considerando-se o uso popular e a escassez de informações sobre sua toxicidade, esse trabalho teve a finalidade de estabelecer a toxicidade oral aguda do extrato etanólico das raízes de *K. tomentosa* (EEKt) e da sua fração hexânica (FHEEKt) em ratas Wistar, bem como estudar o seu potencial tóxico sobre o sistema reprodutor masculino e feminino e órgãos vitais de ratos e suas proles. Para a investigação da toxicidade oral aguda, 30 ratas foram distribuídas nos grupos controles (água destilada e Tween 80 2%) e tratados nas doses de 300 ou 2000 mg/kg do extrato e da fração hexânica (n=3), em dose única. Cada dose foi testada duas vezes, para posterior estimativa da DL₅₀ (OECD-423/2001). Avaliou-se o peso corporal, consumo de água e ração, *screening* hipocrático e o comportamento. Na avaliação da toxicidade reprodutiva, ratos e ratas Wistar foram divididos em quatro grupos de 12 animais cada, sendo 3 tratados com o EEKt nas doses de 125, 500 ou 2000 mg/kg, e um controle, que recebeu água destilada, por via oral, uma vez ao dia. A avaliação do potencial tóxico do EEKt sobre o sistema reprodutor masculino foi realizada após o tratamento dos ratos durante 52 dias consecutivos (período correspondente a um ciclo espermatogênico). Para a avaliação do efeito do extrato na pré-implantação, as ratas foram tratadas do 1º ao 7º dia de prenhez, enquanto na avaliação da pós-implantação, as ratas foram expostas ao EEKt a partir do 8º dia de prenhez até o término da lactação. Os animais foram avaliados quanto à ocorrência de sinais gerais de toxicidade, consumo de água e ração, análises bioquímica, hormonal e hematológica, peso corporal, de órgãos vitais e reprodutores, e índices reprodutivos. Nos machos, avaliou-se também a produção e morfologia espermática. As proles foram avaliadas quanto ao desenvolvimento geral, reflexológico e comportamental. Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade oral aguda mostraram que o EEKt e a FHEEKt apresentaram baixa toxicidade, evidenciada pela ausência de mortalidade ou morbidade nos grupos experimentais. Nos ensaios de toxicidade reprodutiva, o peso corporal de machos foi reduzido pelo EEKt nas doses de 125, 500 e 2000 mg/kg. As fêmeas expostas ao EEKt, durante a pré-implantação, tiveram o consumo de água e ração reduzidos e um aumento no índice de perdas pré-implantação na dose de 2000 mg/kg. No período de pós-implantação e lactação, registraram-se mortes maternas, aumento no índice de perdas pós-implantação e um decréscimo no índice de desmame nas doses de 500 mg/kg e 2000 mg/kg do extrato. Os descendentes apresentaram atraso no desenvolvimento dos reflexos de andar adulto e de geotaxia negativa. Os resultados sugerem que o tratamento com o EEKt ou FHEEKt, em dose única, apresenta baixa toxicidade, no entanto, quando o EEKt é administrado em fases críticas do processo reprodutivo, há indícios de um possível efeito tóxico sistêmico e sobre o sistema reprodutor de ratos e ratas Wistar.

Palavras-chave: *Krameria tomentosa*, fertilidade, ratos, toxicidade reprodutiva, prole.

Abstract

ABSTRACT

Krameria tomentosa (“carrapicho de cavalo” or “ratainha-da-terra”) is a shrub used in folk medicine for its astringent action. Considering its popular use and the lack of information about its toxicity, this study aimed to establish the acute oral toxicity of the ethanolic extract of the roots of *K. tomentosa* (EEKt) and its hexane fraction (FHEEKt) in Wistar rats, and to study the toxic potential on the male and female reproductive system and vital organs and their offspring. For the investigation of the acute oral toxicity, 30 females rats were divided into control (distilled water and Tween 80 2%) and treated groups that received the extract and hexane fraction at dose levels of 300 or 2000 mg/kg (n=3). Each dose was tested twice for subsequent estimation of LD₅₀ (OECD-423/2001). The following parameters were analyzed: body weight, water and food intake, Hippocratic screening and behavior. For assessment of reproductive toxicity, female and male Wistar rats were divided into four groups of 12 animals each: three groups treated orally and once daily with EEKt at doses of 125, 500 or 2000 mg/kg, and one control group. For evaluation of the toxic potential of EEKt on the male reproductive system, rats were treated for 52 days (period corresponding to one spermatogenic cycle). On the female reproductive system, female rats were treated from the 1st to the 7th day of pregnancy (pre-implantation), and from the 8th day of pregnancy (post-implantation) until the end of lactation. The animals were evaluated for the occurrence of general signs of toxicity, consumption of water and food, biochemical, hormonal and hematologic analyses, body weight, weight of vital and reproductive organs, and reproductive indexes. In males, sperm production and morphology were also analyzed. The offspring were evaluated for overall development, reflexology and behavioral development. The results obtained in the evaluation of acute oral toxicity showed low toxicity of EEKt and FHEEKt as evidenced by the absence of mortality or morbidity in the experimental groups. In the reproductive toxicity studies, the body weight of males was reduced by EEKt at doses of 125, 500 and 2000 mg/kg. In the females, exposure to EEKt during preimplantation reduced water and food consumption and increased the pre-implantation loss index at the dose of 2000 mg/kg. During post-implantation and lactation, maternal deaths, increased post-implantation loss index and decreased weaning index at doses of 500 and 2000 mg/kg extract were observed. The offspring exhibited late development of adult reflexes and negative geotaxis. The results indicate a low toxicity profile after the single dose treatment with EEKt or FHEEKt but suggest possible systemic toxic effects, and reproductive toxicity in male and female Wistar rats after exposure to EEKt during critical stages of the reproductive process.

Keywords: *Krameria tomentosa*, fertility, rats, reproductive toxicity, offspring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Krameria tomentosa</i> . A. St. Hill no município de Santa Rita-PB. (A) Planta completa. (B) Detalhe da flor e do fruto	30
Figura 2 – Estrutura de neolignanais isolados das raízes de <i>Krameria tomentosa</i> . (1) [1,1'-(E)-propenil- 4-metoxi-3,4'-oxineolignana (<i>ottomentosa</i>)], (2) ácido 2-(2'-hidroxí-4',6'-dimetoxifenil) benzofurano-5-carboxílico (<i>sobralina</i>)], (3) [eupomatenoide 6, (4) di-hidrocarinatidina e (5) 2-(2',4'-di-hidroxifenil)-5-(E)-propenilbenzofurano.....	31
Figura 3 – Esquema representativo das fases de reprodução em mamíferos	33
Figura 4 – Esquema do sistema reprodutor feminino humano (A) e sistema reprodutor de rata (B)	36
Figura 5 – Desenho esquemático do controle hormonal da função ovariana durante a fase folicular do ciclo menstrual. Representação esquemática dos mecanismos de feedback negativo, mostrando a regulação de FSH e LH pela inibina e estradiol, respectivamente (A) e feedback positivo, mostrando as vias para a secreção de LH através da regulação pelo estrogênio (B)	43
Figura 6 – Desenho esquemático do sistema urogenital masculino humano (A) e de rato	44
Figura 7 – Esquema representativo da organização testicular numa secção frontal....	46
Figura 8 – Esquema representativo da espermatogênese humana	51
Figura 9 – Desenho ilustrativo da espermiogênese e do espermatozoide de mamífero	53
Figura 10 – Desenho representativo da regulação hormonal do sistema reprodutor masculino, mostrando o controle endócrino do FSH e LH e o feedback negativo exercido pela testosterona e inibina.....	55
Figura 11 – Esquema do processo de obtenção do EEB de <i>K. tomentosa</i> e da sua fase hexânica.....	61
Figura 12 – Dosagem de testosterona no soro de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias	104
Figura 13 – Dosagem sérica de progesterona em ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....	104
Figura 14 – Concentração de espermatozoides na secreção da cauda do epidídimo esquerdo de ratos nos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (atividades geral, de coordenação motora e muscular) de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt em dose única.....81

Tabela 2 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (atividades geral, de coordenação motora e muscular) de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt em dose única.....82

Tabela 3 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (reflexos e sistema nervoso central) de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt em dose única.....83

Tabela 4 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (reflexos e sistema nervoso central) de ratas dos grupos controle e tratados com o FHEEKt em dose única.....84

Tabela 5 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (sistema nervoso autônomo) de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt em dose única.....85

Tabela 6 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (sistema nervoso autônomo) de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt em dose única.....86

Tabela 7 – Média dos valores de peso corporal e consumo de água e ração de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 ou 2000 mg/kg (T1 e T2).....87

Tabela 8 – Média dos valores de peso corporal e consumo de água e ração de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 ou 2000 mg/kg (T1 e T2).....87

Tabela 9 – Parâmetros observados durante a avaliação comportamental de campo aberto de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 mg/kg (T1 e T2) ou 2000 mg/kg (T1 e T2).....88

Tabela 10 – Parâmetros observados durante a avaliação comportamental de campo aberto de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg (T1 e T2) ou 2000 mg/kg (T1 e T2).....88

Tabela 11 – Peso absoluto de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 mg/kg (T1 e T2) ou 2000 mg/kg (T1 e T2).....89

Tabela 12 – Peso relativo de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 mg/kg (T1 e T2) ou 2000 mg/kg (T1 e T2).....90

Tabela 13 – Peso absoluto de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg (T1 e T2) ou 2000 mg/kg (T1 e T2).....91

Tabela 14 – Peso relativo de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg (T1 e T2) e 2000 mg/kg (T1 e T2).....92

Tabela 15 – Peso dos ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.....94

Tabela 16 – Peso das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....94

Tabela 17 – Peso das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação.....94

Tabela 18 – Peso das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de lactação.....95

Tabela 19 – Ingestão diária de ração dos ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.....95

Tabela 20 – Ingestão diária de ração das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....95

Tabela 21 – Ingestão diária de ração das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação.....96

Tabela 22 – Consumo de água dos ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.....96

Tabela 23 – Consumo de água das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....96

Tabela 24 – Consumo de água das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação.....97

Tabela 25 – Perfil bioquímico de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.....	98
Tabela 26 – Perfil bioquímico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....	99
Tabela 27 – Perfil bioquímico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.....	100
Tabela 28 – Perfil hematológico de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.....	101
Tabela 29 – Perfil hematológico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....	102
Tabela 30 – Perfil hematológico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.....	103
Tabela 31 – Peso absoluto de órgãos vitais de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.....	106
Tabela 32 – Peso relativo de órgãos vitais, reprodutores e glândulas sexuais acessórias de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.....	107
Tabela 33 – Peso absoluto de órgãos vitais e reprodutores de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....	108
Tabela 34 – Peso relativo de órgãos vitais e reprodutores de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.....	109
Tabela 35 – Peso absoluto de órgãos vitais de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.....	110
Tabela 36 – Peso relativo de órgãos vitais e reprodutores de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.....	111
Tabela 37 – Proporção de espermatozoides normais e anormais de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.....	113

Tabela 38 – Variáveis reprodutivas em ratas (com gravidez interrompida no 15º dia), acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com EEKt durante 52 dias.....	114
Tabela 39 – Machos e fêmeas nascidos e desmamados de fêmeas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.....	115
Tabela 40 – Variáveis reprodutivas em ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com EEKt durante 52 dias.....	116
Tabela 41 – Variáveis reprodutivas em ratas dos grupos controle e tratados com EEKt durante o período de pré-implantação.....	117
Tabela 42 – Variáveis reprodutivas em ratas dos grupos controle e tratados com EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.....	118
Tabela 43 – Machos e fêmeas nascidos e desmamados de ratas dos grupos controle e tratados com EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.....	119
Tabela 44 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole masculina de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.....	120
Tabela 45 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole feminina de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.....	121
Tabela 46 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole masculina de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.....	121
Tabela 47 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole feminina de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.....	121
Tabela 48 – Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos descendentes machos e fêmeas de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt.....	122
Tabela 49 – Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos descendentes machos e fêmeas de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt.....	122
Tabela 50 – Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto na prole de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt.....	123

Tabela 51 – Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto na prole de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt.....123

Tabela 52 – Desenvolvimento reflexológico dos descendentes de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt.....124

Tabela 53 – Desenvolvimento reflexológico da prole de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt.....124

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
EEKt	Extrato etanólico de <i>Krameria tomentosa</i>
EPA	Environmental Protection Agency
e.p.m.	erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio folículo estimulante
FHEEKt	Fração hexânica do extrato etanólico de <i>Krameria tomentosa</i>
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 (dolar)
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

1INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1 Considerações gerais sobre <i>krameria tomentosa</i> A. St. Hill	29
2.2 Estudos de avaliação de toxicidade reprodutiva.....	32
2.3 Anatomia fisiológica do sistema reprodutor feminino.....	35
2.3.1 Ovários.....	36
2.3.2 Tubas uterinas	37
2.3.3 Útero	38
2.3.4 Vagina.....	40
2.4 Regulação hormonal da função ovariana	40
2.5 Sistema reprodutor masculino.....	44
2.5.1 Testículos.....	45
2.5.2 Epidídimo e ducto deferente.....	46
2.5.3 Vesículas seminais	48
2.5.4 Próstata.....	48
2.5.5 Pênis	49
2.6 Espermatogênese	50
2.6.1 Espermio gênese	52
2.6.2 Controle hormonal da espermatogênese.....	53
3OBJETIVOS	57
3.1Geral	58
3.2Específicos.....	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Local da pesquisa	60
4.2 MATERIAL	60
4.2.1 Material vegetal.....	60

4.2.2 Animais	62
4.2.3 Substâncias	62
4.2.4 Aparelhagem.....	63
4.3 MÉTODOS.....	64
4.3.1 Preparação das soluções do EEKt e da FHEEKt	64
4.3.2 Avaliação da toxicidade oral aguda do EEKt e da FHEEKt.....	64
4.3.3 Ensaios de toxicidade reprodutiva de ratos e ratas Wistar expostos ao EEKt	65
4.3.3.1 Determinação das doses e distribuição dos grupos	65
4.3.3.2 Acasalamento e diagnóstico de prenhez	67
4.3.3.3 Avaliação da fertilidade e da capacidade reprodutiva de ratos	67
4.3.3.3.1 Parâmetros avaliados nos machos.....	68
4.3.3.3.2 Parâmetros avaliados nas fêmeas não tratadas	71
4.3.3.4 Avaliação da fertilidade e da capacidade reprodutiva de ratas	72
4.3.3.4.1 Exposição no período de pré-implantação.....	73
4.3.3.4.2 Exposição no período de prenhez (pós-implantação) e lactação	74
4.3.4 Parâmetros avaliados na progênie	76
4.3.5 Análise estatística	78

5 RESULTADOS 79

5.1 Avaliação da toxicidade oral aguda em ratos wistar submetidos à administração do extrato etanólico e da fração hexânica de <i>Krameria tomentosa</i>	80
5.1.1 Parâmetros gerais	80
5.2 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratos e ratas Wistar expostos ao extrato etanólico de <i>Krameria tomentosa</i>	93
5.2.1 Sinais gerais de toxicidade.....	93
5.2.2 Evolução ponderal e consumo de água e ração	93
5.2.3 Parâmetros sanguíneos: hematológicos, bioquímicos e hormonal	97
5.2.4 Análise macroscópica dos órgãos vitais e reprodutores	105
5.2.5 Índice de fertilidade e reprodução.....	112
5.2.5.1 Avaliação da capacidade reprodutiva de ratos Wistar expostos ao EEKt	112

5.2.5.1.2 Parâmetros avaliados nas fêmeas não tratadas e acasaladas com ratos tratados	113
5.2.5.2 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratas Wistar expostas ao EEKt	116
5.2.5.2.1 Exposição durante o período de pré-implantação embrionária	116
5.2.5.2.2 Exposição durante o período gestacional (pós-implantação) e lactação.....	117
5.3 Parâmetros avaliados na progênie	120
6 DISCUSSÃO.....	125
7 CONCLUSÕES.....	148
8 PERSPECTIVAS	147
REFERÊNCIAS	150
ANEXOS.....	179

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais desempenham um papel fundamental na pesquisa farmacológica e na proteção à saúde, pois podem atuar como fármacos ou fornecer a matéria-prima para sua produção (JOHN, 2010). Estima-se que cerca de 40% de todos os medicamentos disponíveis sejam provenientes da natureza ou de derivados semissintéticos (CRAGG, NEWMAN 2013).

As propriedades terapêuticas de muitas plantas medicinais foram descobertas por meio da observação e experimentação popular. Desde a antiguidade, elas são utilizadas pelos seres humanos no tratamento de suas doenças e, durante muito tempo, por razões econômicas ou culturais, foram a principal alternativa de cura da população mundial (BARROS; DAVINO, 1996; BHAGAVATHULA; ELNOUR; SHEHAB, 2016).

Neste contexto, o reservatório de recursos farmacêuticos disponíveis na natureza confere grande incremento nas vendas da indústria farmacêutica, através do surgimento de novos produtos e medicamentos inovadores (CRAGG, NEWMAN 2013; TERRA JUNIOR; MALDONADO; ARNOBIO, 2015). O uso de preparações fitoterápicas aumentou consideravelmente nos últimos anos entre todos os grupos socioeconômicos da população, sendo atualmente um importante setor mundial que movimenta cerca de US\$ 44 bilhões por ano e, no Brasil, em torno de US\$ 550 milhões/ano. Entre os fatores de atração para o aumento do consumo de plantas medicinais e de fitoterápicos, está o custo acessível à população, além da veiculação da falsa ideia de que as preparações à base de produtos naturais são isentas de efeitos tóxicos. Entretanto, o seu uso sob o ponto de vista terapêutico não deve ser indiscriminado e a automedicação deve ser desestimulada, pois segundo a toxicologia, toda substância, mesmo sendo de origem natural, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, dose administrada e das vias de administração (BARROS; DAVINO, 1996; LIMA et al., 2014, ARAÚJO et al., 2015; MACHADO DE OLIVEIRA; COIMBRA; SIQUEIRA, 2014; TERRA JUNIOR; MALDONADO; ARNOBIO, 2015).

Muitas plantas são descritas como sendo potencialmente tóxicas ao sistema reprodutor, devido aos seus efeitos embriotóxico, teratogênico e abortivo (RODRIGUES, et al., 2011). O processo reprodutivo representa o modo de manutenção e perpetuação das espécies, com toda a dinâmica que o mesmo pressupõe, dada a necessidade da interação de componentes fisiológicos, psicológicos e comportamentais (RODRIGUES; FAVARETTO, 1999; LEVIN; RILEY, 2007). Desta forma, a avaliação da interferência de agentes tóxicos, como fármacos, mutagênicos e pesticidas sobre o funcionamento do sistema reprodutor masculino e feminino é fundamental para garantir a sobrevivência da espécie, visto que muitos agentes tóxicos podem comprometer a fertilidade e a capacidade reprodutiva (SUTER et al., 1998; LANGELOH; MELLO, 1998; THAKUR, et al., 2003, PARK et al., 2014).

A interferência de agentes tóxicos pode comprometer a performance reprodutiva masculina, através de alterações sobre a espermatogênese, síntese de hormônios sexuais, comportamento sexual e fertilidade (SAVITZ et al., 1994; KIMMEL; CLEGG; CRISP, 1995). Assim, 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). Já a exposição materna a esses agentes, principalmente no primeiro trimestre da gestação, pode causar danos no feto e também na mãe, ocasionando alterações endócrinas e interferência no processo reprodutivo, incluindo infertilidade, comprometimento da gestação e do período lactacional, alterações morfológicas e funcionais do sistema reprodutor, e até indução do parto prematuro e aborto (EPA, 1996; ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000; BACKER, 2001; DAMASCENO et.al, 2008).

Krameria tomentosa A. St. Hill (sinonímia *K. ovata* Berg.) é uma planta medicinal popularmente utilizada no tratamento de várias doenças, a exemplo de diarreia e processos inflamatórios, em razão de suas propriedades adstringentes. É usada no curtume, em virtude do seu elevado percentual de taninos (SIMPSON, 1991; SILVA, 2001).

Outras espécies de *Krameria* são também empregadas no tratamento de diversas enfermidades, incluindo aquelas que acometem o sistema reprodutor feminino

e os órgãos vitais. Porém, há relatos na literatura da existência de espécies do gênero *Krameria* que apresentam atividade abortiva (BARBOZA et al., 2009; PÉREZ-GUTIÉRREZ et al., 2012). Considerando-se que a espécie *K. tomentosa* é usada no tratamento de várias doenças, e que não existem estudos científicos sobre sua toxicidade reprodutiva, esse trabalho teve como propósito investigar a toxicidade oral de *K. tomentosa* e seu potencial tóxico sobre o sistema reprodutor de ratos e ratas e suas proles, com o intuito de contribuir para o aumento do conhecimento científico relacionado à toxicidade dessa espécie vegetal e, dessa forma, fornecer informações sobre seu uso seguro.

Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre *Krameria tomentosa* A. St. Hil

Krameria tomentosa A. St. Hill (sinonímia *K. ovata* Berg.) é um arbusto que mede até 2 m de altura, sendo conhecida popularmente como “carrapicho de cavalo”, “carrapicho”, “ratainha”, “ratainha-da-terra” (Figura 1) (SILVA et al., 2001). Essa espécie vegetal pertence à família Krameriaceae, a qual possui um único gênero, *Krameria*, com cerca de 17 espécies, que estão predominantemente representadas em regiões neotropicais e restritas a regiões áridas ou sazonalmente secas das Américas (GIMENES; LOBÃO, 2006). O centro primário de diversidade específica está localizado no México, onde ocorrem 11 espécies, e o secundário, no Brasil, com cinco espécies. As espécies da América do Sul estão associadas com áreas sazonalmente secas, principalmente no cerrado e caatinga do Brasil, ou com regiões de altas altitudes nos Andes (SIMPSON, 1989).

As raízes de várias espécies de *Krameria* são usadas na medicina popular nas formas de infuso, decocto e extrato seco ou líquido para o tratamento de diversas enfermidades, como diarreia, úlceras, prevenção de hemorragias, tratamento do câncer de língua, estômago e intestinos; problemas renais, sangramentos gengivais, incontinência urinária e distúrbios que acometem o sistema reprodutor feminino, como processos inflamatórios, gonorreia, indução da menstruação e corrimentos vaginais e uterinos. Além disso, há relatos de efeito abortivo com o uso do decocto das raízes de *K. Ixine* L. e efeitos contraceptivos e abortivo com o infuso das partes aéreas de *K. lappacea* (Dombey) Burdet & B.B.Simpson (SIMPSON, 1991; BARBOZA et al., 2009).

K. tomentosa é bastante utilizada no curtume, por causa da grande porcentagem de tanino presente na sua constituição (SIMPSON, 1991), e na medicina popular, devido à sua ação adstringente. Suas raízes são comumente usadas para o tratamento de estomatites, hemorragias, diarreias, infecções da gengiva, mucos da vagina e uretra, rachaduras do ânus e dos seios (SILVA et al., 2001).

Figura 1 – *Krameria tomentosa*. A. St. Hill no município de Santa Rita-PB. (A) Planta completa. (B) Detalhe da flor e do fruto.

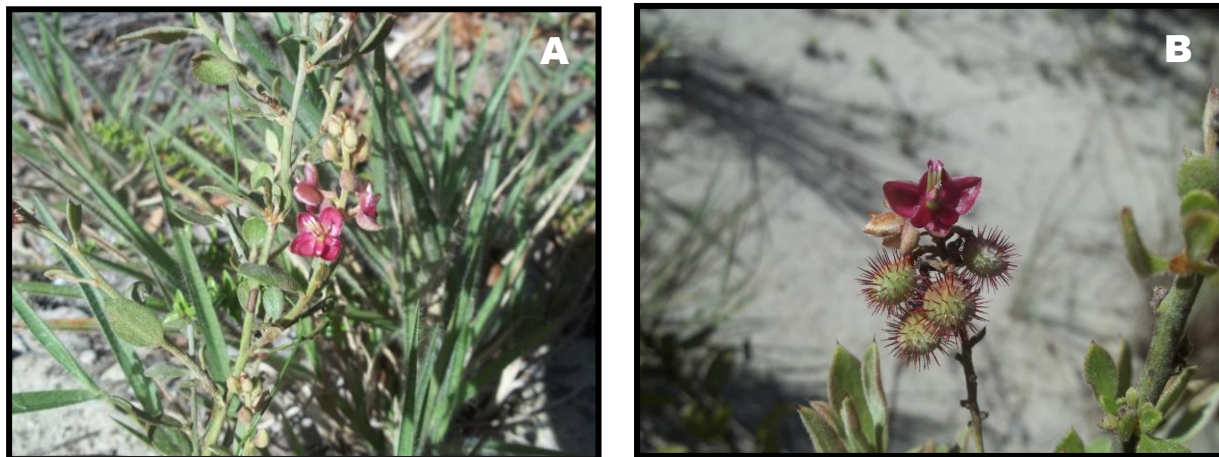


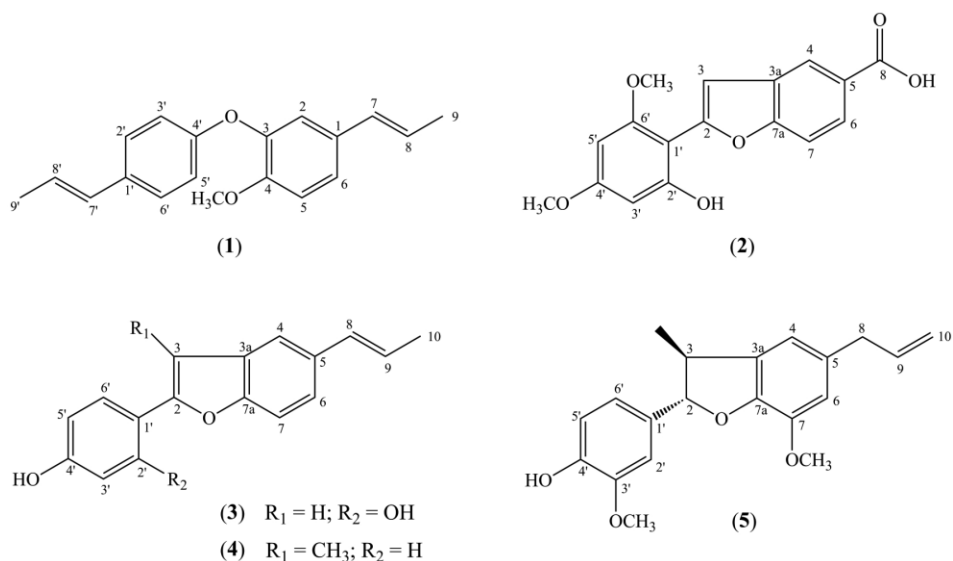
Foto: Josean Fechine Tavares (Santa Rita-PB, 2011).

As espécies da família Krameriaceae são conhecidas por apresentarem, dentre os seus constituintes químicos, diferentes tipos de lignanas e neolignanas (ACHENBACH, 1995; DOMINGUEZ, 1990).

Estudos fitoquímicos de *K. tomentosa* revelaram que a fração hexânica do extrato de suas raízes é rica em lignoides e a partir desta fração, foi isolada uma nor-neolignana benzofurânica, a norlignana 2-(2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-fenil)-5-[(E)-propenil]benzofurano (DMPP) (CASTRO, 1999). Outras lignanas já isoladas nas raízes dessa espécie são: 2-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-5-(E)-propenilbenzofurano (Rataniafenol I) e metil- 2-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-5-benzofurano (Krametosan) (SILVA, 1999; SILVA et al., 2001).

Madeiro e colaboradores (2012) descreveram o isolamento e a estrutura de duas novas neolignanas de *K. tomentosa*: ottomentosa e sobraline (1 e 2), além de três neolignanas já conhecidas: eupomatenóide 6 (3), di-hidro carinatidin (4) e 2-(2,4'-di-hidroxifenil)-5-(E)-propenil benzofurano (5) (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura de neolignanas isoladas das raízes de *Krameria tomentosa*. (1) [1,1'-(*E*)-propenil- 4-metóxi-3,4'-oxineolignana (ottomentosa), (2) ácido 2-(2'-hidróxi-4',6'-dimetoxifenil) benzofurano-5-carboxílico (sobralina)], (3) [eupomatenoide 6, (4) di-hidrocarinatidina e (5) 2-(2',4'-di-hidroxifenil)-5-(*E*)-propenilbenzofurano.



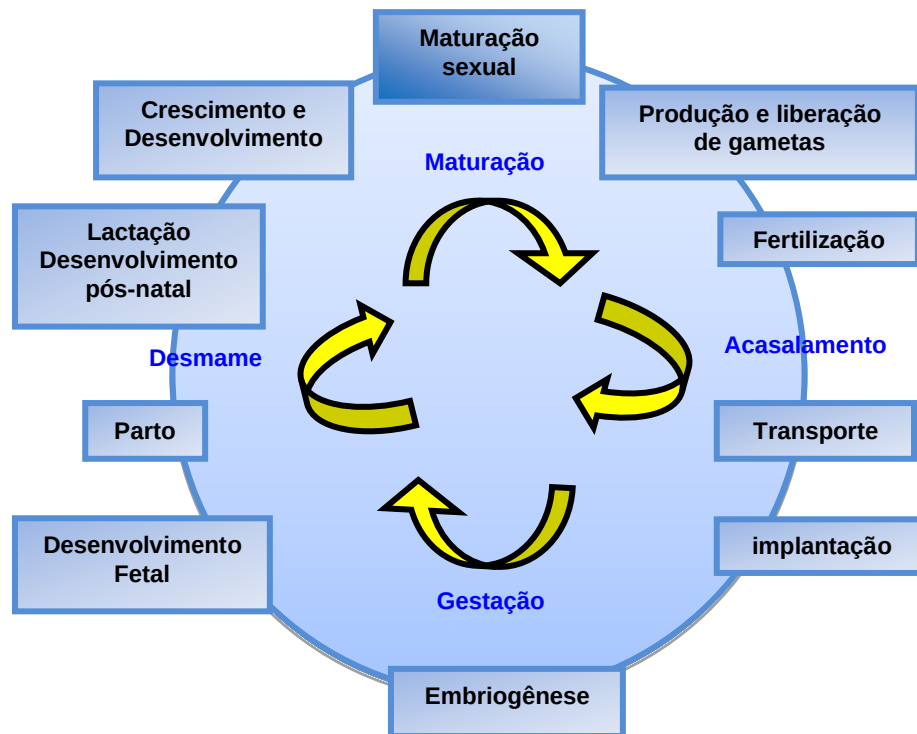
Fonte: MADEIRO et al., 2012.

As lignanas e neolignanas são metabólitos secundários encontrados em muitas plantas e são caracterizadas pelo acoplamento de duas unidades fenilpropanoides. Trata-se de uma classe de produtos naturais de grande relevância terapêutica, em virtude de suas atividades biológicas e farmacológicas. Entre as atividades biológicas relatadas para essas substâncias, destaca-se sua ação antifúngica, leishmanicida, antioxidante, inseticida, esquistossomicida, antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica (CHAURET et al., 1996; COW; LEUNG; CHARLTON, 2000; DE SOUZA et al, 2005; DA SILVA FILHO et al., 2008; DE SOUSA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012). Entretanto, apesar das diversas propriedades farmacológicas atribuídas aos lignoides, estudos evidenciaram efeitos adversos de lignanas na gestação e na lactação, interferindo no metabolismo dos hormônios sexuais e afetando a reprodução e fertilidade (TOU, CHEN, THOMPSON, 1998; ADLERCREUTZ et al., 2002).

K. tomentosa é pouco relatada na literatura em relação aos seus aspectos farmacológicos e toxicológicos. Em estudos farmacológicos realizados com um composto isolado desta planta, o DMPP, verificou-se que essa substância não altera as contrações induzidas por carbacol em íleo e traqueia de cobaia, porém inibe a vasodilatação induzida por acetilcolina em aorta de rato, por provável redução na síntese de óxido nítrico pelas células endoteliais (CASTRO et al., 2005). Em uma triagem farmacológica de plantas do Nordeste brasileiro, realizou-se o teste de toxicidade aguda e observou-se que o extrato etanólico das raízes de *K. tomentosa* apresentou toxicidade para camundongos e peixes, entretanto este estudo não avaliou a dose letal mediana (DL₅₀), o que não permite uma conclusão a cerca da toxicidade desta espécie (VIEIRA et al., 1968).

2.2 Estudos de avaliação da toxicidade reprodutiva

A reprodução em mamíferos compreende um processo complexo, dividido em etapas: pré e pós-natal, amadurecimento sexual e acasalamento (Figura 3). Nesse contexto, os ensaios não clínicos de toxicidade reprodutiva tem o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos de uma determinada substância em cada uma dessas fases. Além disso, avalia o seu potencial em interferir sobre o sistema reprodutor masculino e/ou feminino e causar danos capazes de comprometer a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embriofetal, o parto e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade sexual (EPA, 1996; LEMÔNICA, 2001; LEMÔNICA et al., 2008; SILVA, 2014).

Figura 3 – Esquema representativo das fases de reprodução em mamíferos.

Fonte: Adaptado de LEMONICA et al., 2008.

Nesses ensaios de toxicidade, o modelo experimental de escolha é o rato e, convencionalmente, utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, sendo a linhagem Wistar a mais frequentemente utilizada (COBEA, 1996; LEMONICA, 2001; HOLLENBACH et al., 2010). Os coelhos também são usados como modelo biológico para a avaliação dos efeitos de xenobióticos sobre a reprodução e fertilidade (NEUBERT et al., 1977). A via de administração oral é a mais adotada porque possibilita a determinação da dosagem precisa da substância teste e a padronização dos níveis plasmáticos maternos. Contudo, outras vias de administração também podem ser empregadas, dependendo das condições de exposição e características físico-químicas da substância em análise (LEMÔNICA, 2001).

Os estudos de toxicidade reprodutiva compreendem 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 a 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 análise da toxicidade reprodutiva geralmente inclui, além desses protocolos, o teste do letal dominante e 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 (ZENICK et al., 1994; SÁ, 2003, ROCHA, 2012).

A realização desses estudos é importante porque permite avaliar o efeito de uma substância sobre o processo reprodutivo em diferentes fases do desenvolvimento, abrangendo desde o período neonatal até a idade adulta e reprodutiva. A performance reprodutiva masculina pode ser analisada a partir de alterações em parâmetros, como produção, maturação, morfologia e transporte de gametas, além de mudanças no comportamento sexual, enquanto que a capacidade reprodutiva feminina pode ser estudada pela ocorrência de alterações, como disfunção endócrina e aborto, além da ocorrência de efeitos teratogênicos no feto (HOLLENBACH, 2008; KUNTZE et al., 2012; SANTOS, 2014).

As plantas medicinais possuem constituintes químicos capazes de causar vários danos ao sistema reprodutivo, podendo promover, por exemplo, prejuízos à

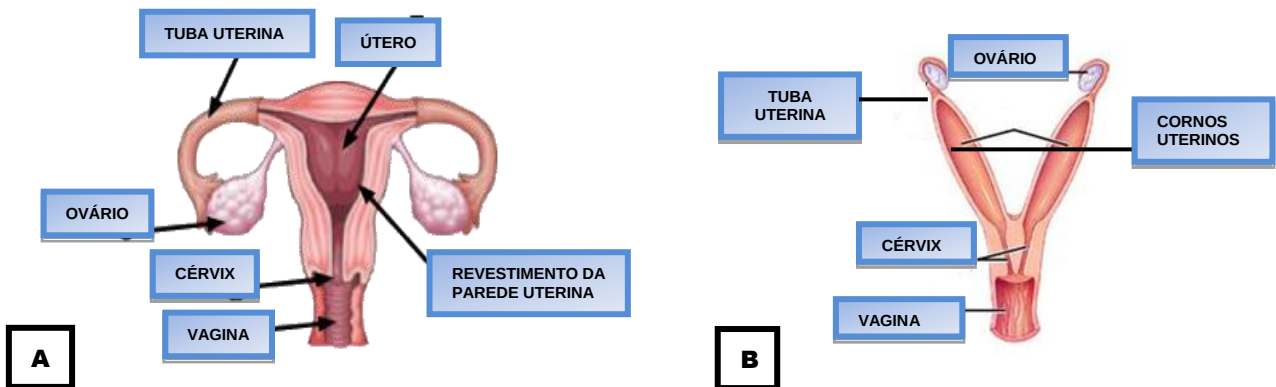
fertilidade, morfologia dos órgãos reprodutores, gestação e ao desenvolvimento embrionário. Porém, muitos produtos derivados de plantas são rotineiramente utilizados sem a prévia realização de estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva (MÜLLER et al., 2009; SANTOS, 2014). A realização de ensaios de toxicidade reprodutiva é, portanto, fundamental 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 et al., 1995; HOLLENBACH, et al., 2010). Esses ensaios envolvem além da avaliação de variáveis reprodutivas, a análise de parâmetros clínicos de toxicidade sistêmica, pois um animal debilitado pode ter o seu potencial de fecundidade e fertilidade diminuído (SILVA, 2010).

2.3 Anatomia fisiológica do sistema reprodutor feminino

Assim como na maioria dos mamíferos, o aparelho reprodutor feminino de rato é constituído por dois ovários, duas tubas uterinas, útero, cérvix e vagina. Esse sistema desempenha importante papel na produção e transporte de gametas (ovócitos), além de regulação endócrina e proteção e nutrição do embrião (Figura 4) (HEBEL; STROMBERG, 1976; GUYTON; HALL, 2006; SILVA, 2012; SILVA, 2014).

As ratas apresentam seis pares de glândulas mamárias: três na região torácica, um na abdominal e dois na inguinal (ANDERSEN et al., 2004).

Figura 4 – Esquema do sistema reprodutor feminino humano (A) e sistema reprodutor de rata (B).



Fonte: Adaptado de <http://www.sciencequiz.net>; <http://www.mhhe.com>.

2.3.1 Ovários

Os ovários encontram-se localizados na cavidade pélvica superior, um de cada lado do útero, medem cerca de 2 a 4 cm de comprimento e apresentam a forma elíptica. São formados por três regiões distintas: o córtex, revestido por um epitélio germinativo e constituído por tecido conjuntivo e folículos, no interior dos quais se encontram os ovócitos; a região medular, que consiste em uma camada innervada e vascularizada, composta de células heterogêneas; e o hilo, formado por células produtoras de esteroides (VANDER; SHERMAN; LUCIANO, 2002; WIDMAIE, RAFF, STRANG; 2006; LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006).

A função ovariana está relacionada à ocorrência da ovogênese, que corresponde à produção dos gametas femininos (ovócitos), sua maturação e eliminação (ovulação), além da secreção de hormônios sexuais e esteroidais (estrogênio e progesterona). Durante a ovogênese, ocorre uma sequência de eventos, na qual, inicialmente, há a diferenciação de células germinativas primordiais em ovogônias. Estas, por sua vez, transformam-se em células maiores, denominadas ovócitos primários, que posteriormente diferenciam-se em ovócitos secundários, quando ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Esse processo finaliza-se com

a fecundação do ovócito maduro e a liberação do segundo corpúsculo polar. A foliculogênese inicia-se com a formação dos folículos primordiais, que progridem para primários, secundários, terciários, pré-ovulatórios e termina quando há a ovulação de um ovócito maduro (SILVA, 2012; ADONA et al., 2015).

O ciclo ovariano apresenta-se dividido em três fases: folicular, que ocorre entre o 1º e o 13º dia do ciclo, caracterizada pelo crescimento, desenvolvimento e maturação dos folículos; uma fase ovulatória, que ocorre no 14º dia do ciclo, quando há a ruptura do folículo maduro e a fase lútea, entre o 15º e o 28º dia do ciclo, quando há a formação do corpo lúteo (SILVA, 2012; LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006; FOX, 2007).

Em ratas, os ovários são formados por um epitélio germinativo e por uma camada de tecido conjuntivo, chamada de túnica albugínea, e encontram-se envolvidos por uma membrana denominada de bursa ovariana. Esses órgãos são formados por duas regiões distintas, o córtex (zona parenquimatosa), formado por tecido conjuntivo denso, onde se encontram os folículos, corpo lúteo e glândulas intersticiais; e uma zona medular, formada por tecido conjuntivo frouxo, constituído de vasos sanguíneos, nervos e glândulas intersticiais (WALKER; HOMBERGER, 1997; HASCHEK et al., 2010).

As principais funções dos ovários de ratas consistem na ovogênese e na secreção de progesterona e de estrógeno (OHKURA et al., 2000).

2.3.2 Tubas uterinas

As tubas uterinas (ovidutos) são dois ductos, medindo cerca de 10 cm de comprimento e que unem o ovário ao útero. Suas paredes encontram-se envolvidas por uma camada muscular que envolve uma camada mucosa revestida por um epitélio, contendo células ciliadas e secretórias. Cada tuba termina em projeções digitiformes, denominadas fímbrias, responsáveis pela comunicação dos ovários com o útero. Em ratas, a tuba uterina apresenta-se dividida em quatro segmentos: infundíbulo (pré-ampola), ampola, istimo e porção intramural, que corresponde à

região de transição entre o oviduto e o corno uterino (ALLEGRI, 2000; SILVA, 2014).

A tuba uterina tem a função de receber o ovócito e fornecer as condições necessárias para sua fertilização. Após a fecundação, os batimentos ciliares e os movimentos peristálticos das tubas uterinas conduzem o gameta feminino até o útero (OLIVEIRA et al., 2005; NASCIMENTO; SANTOS, 2002; RASWEILER IV; BADWAIK, 1999).

2.3.3 Útero

O útero tem a função de abrigar e nutrir o feto, desde o seu desenvolvimento até o nascimento. É um órgão muscular, situado na cavidade pélvica, entre a bexiga urinária e o reto, medindo cerca de 7,5 cm de comprimento e 5 cm de largura, na ausência de gravidez. A parede uterina encontra-se organizada em três camadas teciduais diferentes: uma camada conjuntiva externa (perimétrio), responsável pelo revestimento epitelial do órgão; uma camada muscular intermediária (miométrio) e uma camada mucosa interna (endométrio), constituída por um revestimento epitelial e tecido conjuntivo (estroma endometrial) (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006; GRUBER; O'BRIEN, 2011; RIBEIRO, 2013).

O ciclo uterino, também chamado de ciclo menstrual, reflete as mudanças ocorridas no endométrio e durante o ciclo ovariano, em consequência da ação dos hormônios estrogênio (estradiol) e progesterona. Cada ciclo uterino dura cerca de 28 dias e apresenta três fases distintas: fase menstrual, proliferativa e secretora. A fase menstrual dura aproximadamente 5 dias e resulta da descamação do endométrio e da ruptura dos vasos sanguíneos, constituindo o fluxo menstrual, que ocorre devido à constrição das artérias espirais presentes na camada funcional do endométrio, e à baixa concentração de hormônios ovarianos nesse período. A fase proliferativa dura cerca de 9 dias e caracteriza-se pelo aumento da espessura tecidual do endométrio e desenvolvimento das artérias espirais, com consequente reconstituição do endométrio e dos vasos sanguíneos. A fase secretora dura cerca de 14 dias e é nesse período que a parede uterina interna atinge sua espessura máxima. Nessa fase, as glândulas do endométrio produzem secreções, preparando o útero

para a recepção do embrião (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006; GORE; 2008; MICHALAKIS; SEGARS, 2010).

O ciclo menstrual das ratas é denominado ciclo estral, o qual se inicia entre o 32º e 36º dia de idade e dura em média de quatro a cinco dias, podendo sofrer variações (GOLDMAN et al., 2007; MÜLLER, 2007). Esse ciclo apresenta-se dividido em quatro fases: proestro, estro, diestro I ou metaestro e diestro II, sendo diferenciadas pela predominância do tipo celular presente no fluido vaginal, além das mudanças comportamentais observadas nos animais (MAEDA et al., 2000; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; GONZALEZ, 2010).

O proestro caracteriza-se pela predominância de células epiteliais nucleadas e arredondadas encontradas no fluido vaginal e tem duração média de 12h. O estro, apresenta predomínio de células cornificadas, com aspecto de folhas secas e dura cerca de 24h, período em que a fêmea torna-se receptiva ao macho. O metaestro, com duração de 24 a 48h, corresponde ao período entre o estro e o diestro II, reconhecido pela presença de células cornificadas e leucócitos. O diestro dura cerca de 24h e o esfregaço vaginal nessa fase possui elevado número de leucócitos, poucas células cornificadas, algumas células epiteliais e muco, sendo formado majoritariamente por leucócitos. Nesta fase, reinicia-se a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo (VILELA, DOS SANTOS JÚNIOR, SILVA; 2007; GOLDMAN et al., 2007; LONG; EVANS, 1922; CHEN et al., 2009; GONZALEZ, 2010).

A ovulação das ratas se inicia no proestro e termina no estro e, de forma semelhante aos demais mamíferos, a atividade ovariana é regulada pelos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), secretados pela hipófise (OHKURA et al., 2000; SILVA, 2014).

A gestação das ratas dura em média 21 dias e elas atingem a maturidade sexual por volta dos 60 dias de idade, contudo a idade mais usual para a reprodução é aos 90 dias, quando seu sistema reprodutor já se encontra completamente desenvolvido (DUKES, 1996; ANDERSEN et al., 2004; MATTARAIA, 2007).

Devido à curta duração de seu ciclo estral, além das similaridades apresentadas com a gestação de seres humanos, as ratas têm se constituído como

um modelo atraente para a avaliação das alterações ocorridas durante o ciclo reprodutivo (TROINA, 2008; GRAY et al., 2004).

2.3.4 Vagina

O canal vaginal é revestido por um epitélio escamoso estratificado e sensível ao estradiol. Mede cerca de 10 a 15 cm de comprimento e está localizado entre a bexiga e o reto. Essa cavidade é o local onde o pênis deposita os espermatozoides durante o coito (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006; FOX, 2007).

Em ratas adultas, a vagina mede aproximadamente de 0,3 a 0,5 cm e apresenta-se constituída pelas camadas mucosa, muscular e adventícia. A camada mucosa é formada por epitélio estratificado pavimentoso, que apresenta variações de acordo com a fase do ciclo reprodutivo (proestro, estro, metaestro e diestro) (HEBEL; STROMBERG, 1976; SILVA, 2014).

2.4 Regulação hormonal da função ovariana

O eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HHO) é responsável pela regulação do ciclo menstrual, através do controle da secreção e de mecanismos de retroalimentação dos hormônios (Figura 5). O hipotálamo sintetiza e libera o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual passa a atuar na adenohipófise (SILVERTHORN, 2009; MARCONDES, 2012). O GnRH, por sua vez, estimula a hipófise a secretar duas gonadotrofinas: o FSH e o LH, os quais, ao atuarem nos folículos ovarianos, desencadeiam uma série de efeitos tróficos e estimulam a produção de estrogênio e de progesterona (TERRES, 2005; MONTENEGRO, 2012; KRSMANOVIC et al., 2003; ARRUDA, 2013). O FSH é fundamental para a manutenção da função ovariana. Este hormônio atua nas células da granulosa e está envolvido no estímulo do crescimento e diferenciação folicular, indução da síntese de receptores de LH e secreção de estradiol. O LH age nas células da teca interna, estimulando a produção de androgênios e, no corpo lúteo, estimula a produção de

progesterona (LEVI-SETTI et al., 2004; MARTINS et al., 2008; LEITE, 2008; MARCONDES, 2012).

O GnRH é secretado pelos neurônios hipotalâmicos (neurônios-GnRH), de forma pulsátil, favorecendo a produção também pulsátil do LH e do FSH. Essa forma coordenada de secreção das gonadotrofinas é essencial para o controle e a manutenção do ciclo ovariano e uterino, sendo atribuída às características intrínsecas dos neurônios-GnRH e ao efeito de vários hormônios e neurotransmissores que atuam como moduladores da secreção do GnRH (NAOR; CHILDS, 1986, CLARK; MELLON, 1995; VAZQUEZ-MARTINEZ et al., 2002; RAVE-HAREL et al., 2004; PARENT et al., 2011; MARCONDES, 2012).

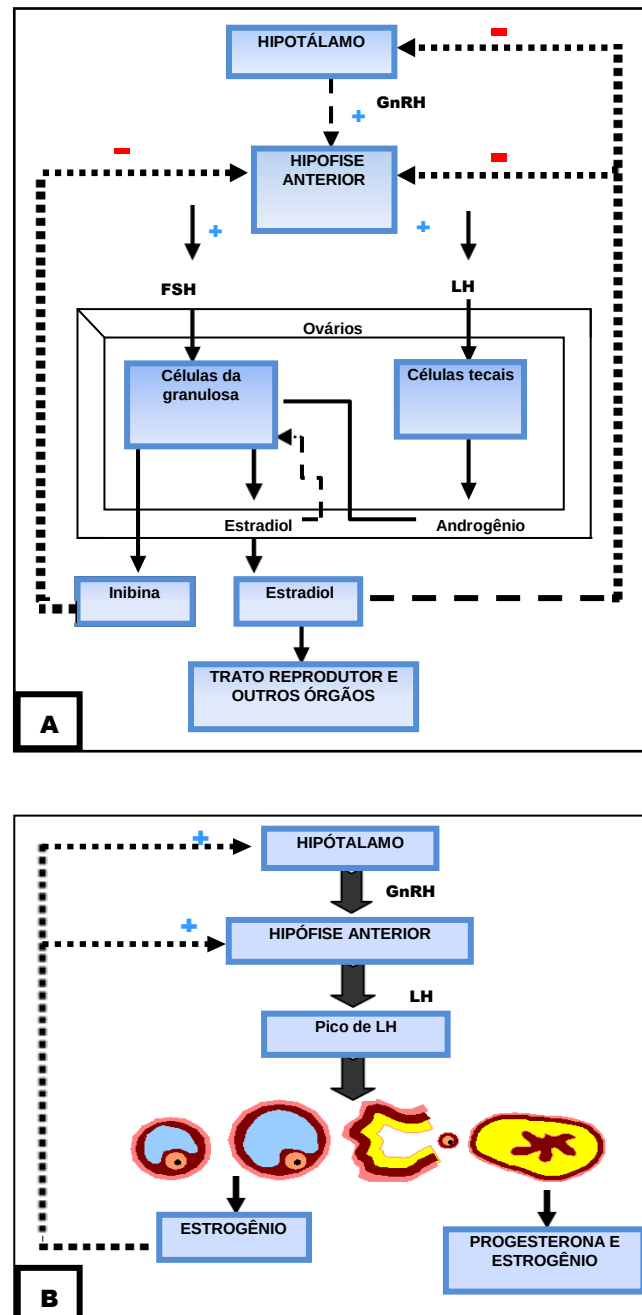
O ciclo menstrual depende de mecanismos de *feedback* positivo e negativo ocorridos no ovário. Normalmente, o estradiol exerce *feedback* negativo sobre a liberação de GnRH, pelo hipotálamo, e sobre a liberação de FSH e LH, pela hipófise. Além disso, as células da granulosa secretam inibina, um hormônio polipeptídico, que inibe especificamente a secreção de FSH pela hipófise anterior (SILBERSTEIN; MERRIAN, 2000; LEITE, 2008). Entretanto, durante a fase folicular do ciclo, quando ocorre aumento rápido dos níveis de estradiol, a alça de *feedback* negativo é ineficaz e a hipófise é estimulada a liberar mais gonadotrofinas pelos níveis crescentes de estradiol (BUFFET; BOUCHARD, 2001).

Dessa forma, o estradiol secretado pelas gônadas (ovários), durante a fase proliferativa, tem efeito de retroalimentação positiva sobre a hipófise, gerando o pico de LH antes da ovulação. A inibina é então liberada e atua no controle por retroalimentação negativa sobre a secreção de FSH. Na fase secretória, após a liberação do ovócito, ocorre a formação do corpo lúteo, acompanhada da elevação dos níveis de progesterona e estradiol. Durante essa fase, há o predomínio do *feedback* negativo, refletindo na diminuição da secreção de GnRH e FSH/LH, respectivamente. Quando não há a fertilização do ovócito pelo espermatozoide, o corpo lúteo regride, dando início a um novo ciclo (MESSINIS, 2006; NAOR, 2008; MAFFUCCI; GORE, 2009).

Desreguladores endócrinos são substâncias capazes de interferir sobre o sistema endócrino e provocar desequilíbrios nos níveis de hormônios e,

consequentemente, de suas funções. Vários estudos já apontaram os efeitos dessas substâncias sobre o funcionamento do sistema reprodutor feminino, podendo causar distúrbios menstruais, infertilidade; comprometimento da gestação, lactação e da prole (EPA, 1996; AZIZ et al., 2001; GORE et al., 2011; CASERTA et al., 2014).

Figura 5 – Desenho esquemático do controle hormonal da função ovariana durante a fase folicular do ciclo menstrual. Representação esquemática dos mecanismos de feedback negativo, mostrando a regulação de FSH e LH pela inibina e estradiol, respectivamente (A) e feedback positivo, mostrando as vias para a secreção de LH através da regulação pelo estrogênio (B).

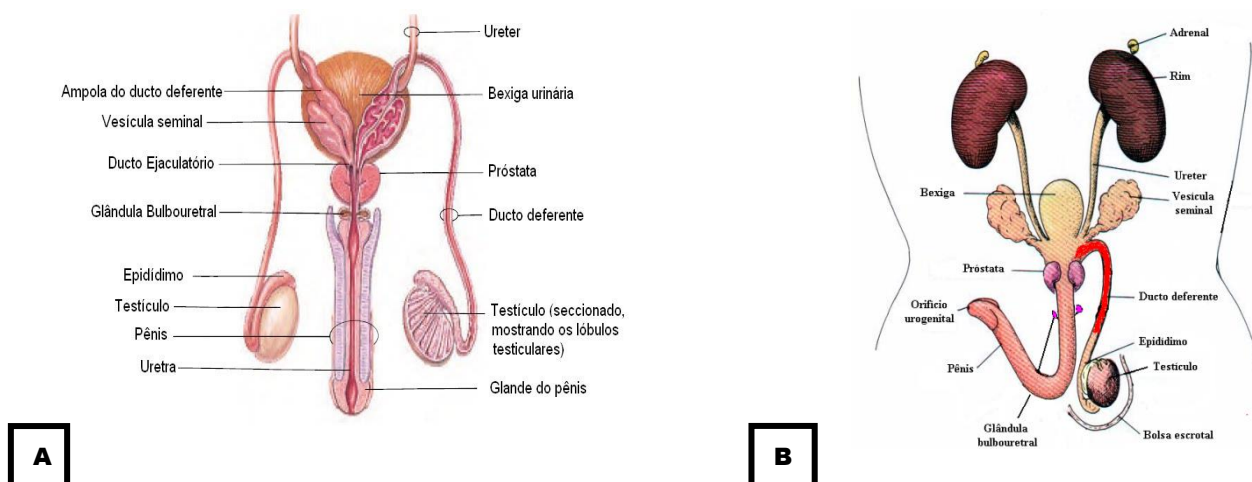


Fonte: Adaptado de LEITE, 2008.

2.5 Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino de rato assemelha-se ao sistema reprodutor da maioria dos mamíferos, sendo formado pelas gônadas (testículos), epidídimos, canais deferente, ducto ejaculador, uretra, pênis e pelas glândulas acessórias, que incluem as vesículas seminais, a próstata e a glândula bulbouretral (Figura 6). Esse sistema é responsável pela produção, transporte, maturação, capacidade de mobilidade e eliminação dos gametas masculinos (espermatozoides) além da produção e secreção de testosterona (BÚFALO, 2007; KEMPINAS, KLINEFELTER, 2010).

Figura 6 – Desenho esquemático do sistema urogenital masculino humano (A) e de rato (B).



Fonte: Adaptado de http://www.biologycorner.com/worksheets/rat_urogenital.html.

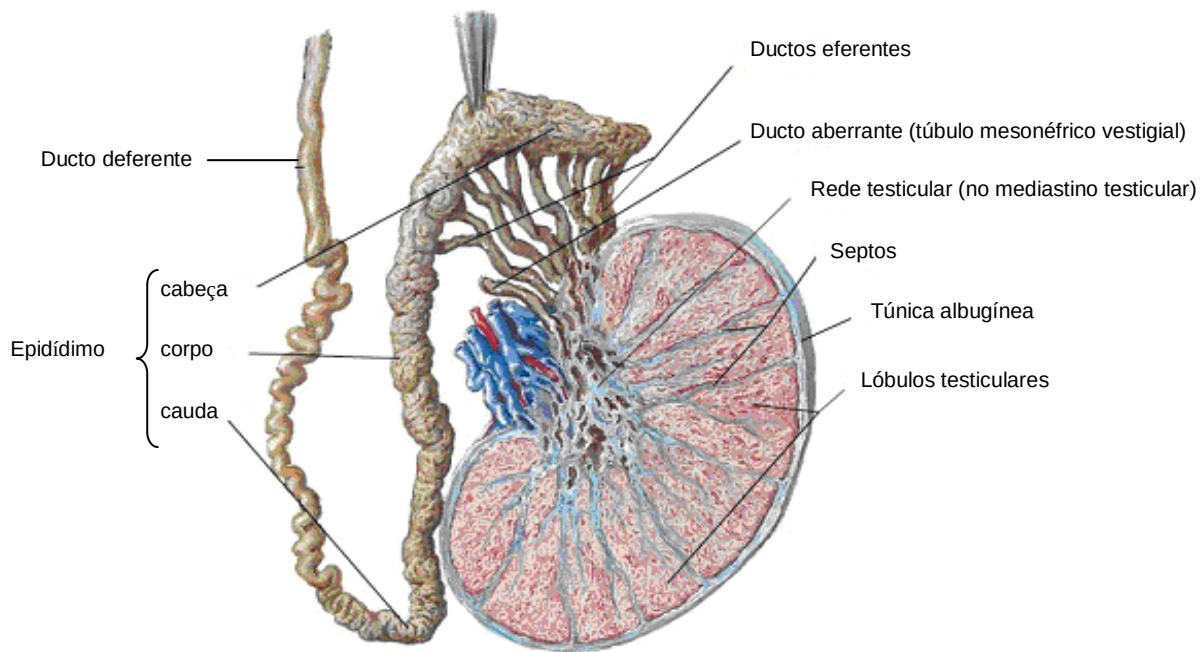
2.5.1 Testículos

Os testículos são órgãos pares e apresentam-se na forma ovoide, localizados abaixo do pênis, na parte anterior do períneo e alojados nas bolsas escrotais, onde ficam suspensos 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; SANTOS, 2014).

As gônadas masculinas compreendem dois compartimentos: intersticial, constituído por tecido conjuntivo frouxo e vários tipos celulares, incluindo as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona (esteroidogênese); e um compartimento tubular, formado pelos túbulos seminíferos, onde estão localizadas as células de Sertoli, responsáveis pela produção de espermatozoides (espermatogênese) (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999; FERNANDEZ, 2006; ROSS, PAWLINA, 2012).

As gônadas masculinas encontram-se envolvidas por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea. O tecido conjuntivo da túnica albugínea é contíguo ao tecido conjuntivo laxo que forma septos, dividindo o parênquima testicular em lóbulos, onde se encontram os túbulos seminíferos. Estes, por sua vez, convergem para o mediastino dos testículos, formando a rede testicular (rede testis), que junto com os vasos eferentes constituem os ductos excretores de esperma (Figura 7) (BANZATO, 2010; ROSS, PAWLINA, 2012).

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

Figura 7 – Esquema representativo da organização testicular numa secção frontal.

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

2.5.2 Epid idimo e ducto deferente

Nos mamíferos, o epid idimo encontra-se dividido anatomicamente em três regiões principais: cabeça, local onde ocorre o transporte dos espermatozoides; corpo, região onde ocorre a maturação dos gametas e cauda, onde esses gametas são armazenados (GLOVER, 1982; REID; CLELAND, 1957; HERMO; ROBAIRE, 2002, ARENA, 2006). O epid idimo é um órgão formado por um ducto único, longo e bastante enovelado, que faz a conexão entre os ductos eferentes e o ducto deferente. Este  rg o é composto por um epitélio pseudoestratificado ciliado, com diferentes tipos de células: basais, principais, estreitas, halos, claras e apicais. O epitélio epididimário encontra-se envolvido por uma camada muscular lisa, apresentando-se mais fina na região da cabeça e corpo e mais espessa na cauda. Essa camada muscular recebe a inerva o de fibras adrenérgicas do sistema nervoso simpático (HERMO; ROBAIRE, 2002; SULLIVAN et al., 2005; SETCHELL, 2002; ROBAIRE et al., 2006).

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 (ORGEBIN-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 órgão responsável pela ligação entre o epidídimo e a região 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 (HAMILTON; COOPER, 1978; HEBEL; STROMBERG, 1986). O ducto deferente possui mucosa pregueada e revestida por epitélio pseudo-estratificado prismático com estereocílios; lâmina própria de tecido conjuntivo, com muitas fibras elásticas; camada muscular, formada por uma camada média circular e duas camadas longitudinais (interna e externa); e camada adventícia de tecido conjuntivo (ROSS; ROMRELL, 1993). A principal função deste órgão está relacionada ao término do processo de maturação espermática, além do transporte e eliminação do sêmen durante a ejaculação (SETCHELL, 2002).

2.5.3 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 epitélio pseudo-estratificado pregueado, constituído por células epiteliais secretoras e células basais (HAYWARD et al., 1996). As células basais estão dispostas abaixo das células principais. Apresentam núcleos poligonais e centrais com superfícies separadas da luz pelo ápice das células principais, que são colunares com núcleos basais, sendo maiores e mais numerosas que as células basais. A vesícula seminal apresenta-se envolvida por três camadas: 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 (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). Essa glândula exerce papel importante na ejaculação e é controlada pelo sistema nervoso autônomo (KIGUTI; PUPO, 2012).

2.5.4 Próstata

A próstata é uma glândula acessória, formada por glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática e localiza-se em posição caudal à bexiga (ROY-BURMAN et al., 2004; SCHAUER; ROWLEY, 2011).

Apresenta-se envolvida por epitélio colunar simples, formado por células secretoras, basais e neuroendócrinas, e 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; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAU, 2011; CORRADI et al., 2013). 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).

A próstata contribui para a nutrição e suporte dos espermatozoides fora do trato genital masculino e suas funções são dependentes de estímulo androgênico como a testosterona, que atua diretamente nos órgãos sexuais acessórios masculinos (MANN, 1974; SANTOS; 2014).

2.5.5 Pênis

O pênis é o órgão copulador masculino, sendo responsável pela transferência dos espermatozoides para o interior do sistema genital feminino. Anatomicamente, é composto por raiz, corpo e glândula, que é uma dilatação na porção terminal desse órgão. É formado por tecido erétil e pela uretra, que encontram-se envoltos externamente por pele (MENEZES, et al., 2003; SANTOS, 2014).

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

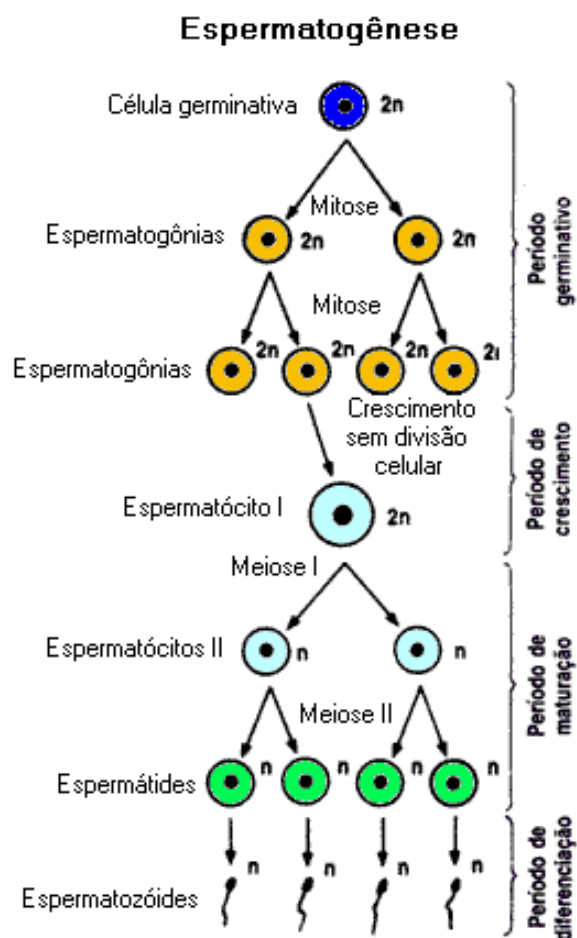
O prepúcio é a prega retrátil da pele do pênis, contendo tecido conjuntivo e músculo liso no seu interior. Observam-se, na sua dobra interna e na pele que recobre a glândula, pequenas glândulas sebáceas (glândulas prepúciais). No rato, estas glândulas possuem um denso parênquima e um sistema ramificado 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 glândula. Este osso inicia-se na transição do corpo para a glândula, como uma continuação do corpo cavernoso do pênis (VILMAM; VILMANN, 1979; HEBEL; STROMBERG, 1986).

2.6 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo complexo, através do qual ocorrem divisões e diferenciação de células germinativas pouco diferenciadas (espermatogônias), para promover a formação de espermatozoides (Figura 8) (McDONALD; PINEDA, 1989; O'DONNEL et al., 2001; HAI, 2014;). Em ratos, ela 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. 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 (McDONALD; PINEDA, 1989; 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, os espermatócitos primários (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). Após a última mitose, quando a espermatogônia do tipo B é formada, ocorre o aparecimento de 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, formando células menores, os espermatócitos secundários. Estas células entram rapidamente na segunda divisão meiótica para gerar células haploides arredondadas, denominadas de espermátides (ROSS; ROMRELL, 1993; O'DONNEL et al., 2001).

Figura 8 – Esquema representativo da espermatogênese humana.

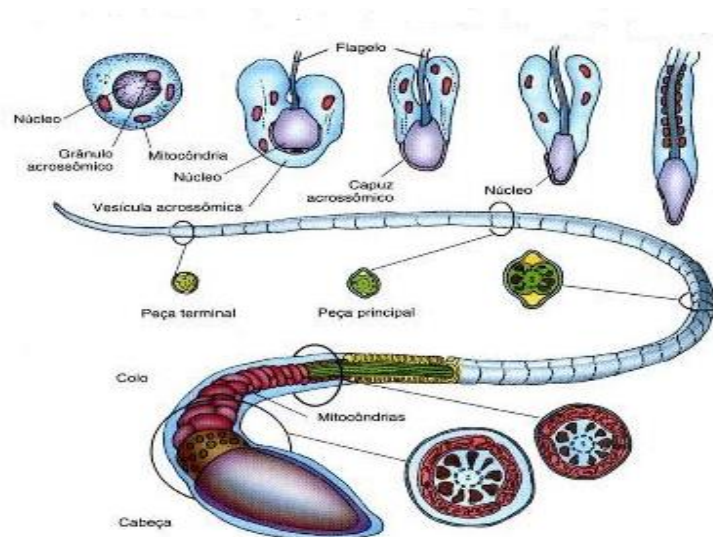
Fonte: Adaptado de <http://www.rincon.com.br/Imagens/gg Espermatogenese.gif>.

2.6.1 Espermiogênese

A espermiogênese tem início nos túbulos seminíferos e termina no epidídimo, caracterizando-se pela diferenciação das espermatídes em espermatozoides, células adequadamente capacitadas para alcançar e fertilizar o gameta feminino (Figura 9) (STANBENFELD; EDQVIST, 1996; HULEIHEL; LUNENFELD, 2004).

Nesta fase, as espermatídes sofrem acentuada metamorfose e se diferenciam da forma celular esférica para células que contêm uma cabeça aerodinâmica, com núcleo condensado, que carrega o genoma masculino, e uma cauda responsável pela motilidade celular. Na fase acrossômica, ocorrem as maiores transformações morfológicas (condensação, alongamento da forma) do núcleo e da membrana, 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; JOHNSON, 1991; PETIT et al., 2013).

Os espermatozoides dos mamíferos são células altamente especializadas, porém quando saem do testículo, ainda são imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito (BROOKS, 1983; HERMO; ROBAIRE, 2002; GATTI et al., 2004; EDDY, 2006; ALBERTS et al., 2008). É durante o trajeto pelo epidídimo que os espermatozoides passam por mudanças morfológicas, fisiológicas e biológicas, que levam à maturação motilidade e habilidade para sofrer a reação acrossômica, interagir com a zona pelúcida, reconhecer e fundir-se com a membrana plasmática do ovócito (ORGBIN-CRIST, 1969, JONES, 1999; CUASNICÚ et al., 2002; GATTI et al., 2004, SULLIVAN et al., 2005; CORADIN, 2013).

Figura 9 – Desenho ilustrativo da espermiogênese e do espermatozoide de mamífero.

Fonte: Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAE3UIAI/slides-espermatogenese>.

2.6.2 Controle hormonal da espermatogênese

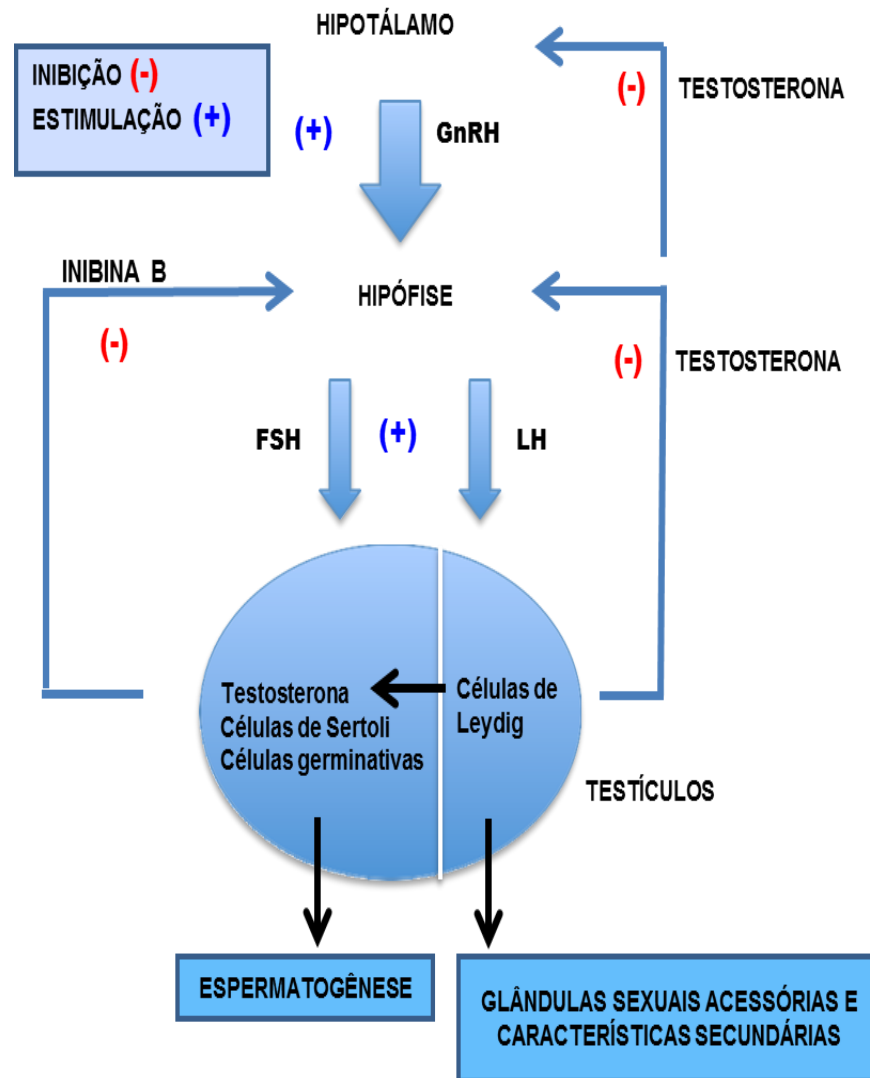
O eixo hipotálamo-hipófise-testículos constitui um sistema integrado, responsável pela adequada secreção de hormônios masculinos e pela ocorrência normal da espermatogênese, pois é regulada por mecanismos endócrinos que envolvem o LH e o FSH (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999; FRAIETTA; ZYLBERSTEJN; ESTEVES, 2013).

O hipotálamo secreta o GnRH, o qual é responsável por iniciar grande parte do controle das funções sexuais masculinas ao estimular a hipófise anterior a secretar o LH e o FSH. O pulso gerador de GnRH é o principal regulador da puberdade, e sua produção começa no início da vida fetal. Como resultado, os níveis de gonadotrofinas sofrem alterações durante o desenvolvimento fetal, infância, puberdade e na idade adulta (SALADIM, 2001; LAYMAN, 2007; SCHLATT, EHMCKE, 2014)

O FSH atua especificamente sobre as células de Sertoli, controlando a proliferação de células germinativas e regulando a produção de espermatozoides no epitélio seminífero. O FSH aumenta a produção de proteína ligadora de andrógenos (ABP) pelas células de Sertoli dos testículos, ligando-se aos receptores FSH nas suas membranas vasolaterais, processo fundamental para o início da espermatogênese. As células de Sertoli desempenham papel fundamental no fornecimento de energia e suporte nutricional, necessários ao desenvolvimento das células germinativas. O LH é o hormônio estimulador das células intersticiais (Leydig), secretoras de testosterona, necessária para o desenvolvimento normal das células da linhagem germinativa, regulação do desenvolvimento testicular, e para a indução ou manutenção das características sexuais secundárias (MEANS, 1976; WRIGHT; FRANKEL, 1979; AWONIYI, et al., 1989; ZIRKIN, 1998; MARTY et al., 2003; BANZATO, 2010; RATO et al., 2012; EHMCKE, 2014; HAI et al., 2014).

A espermatogênese é regulada pela testosterona e pela inibina, através de mecanismos de *feedback* no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Figura 10). 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 da produção de LH pela hipófise anterior reduz a produção de testosterona pelos testículos. Dessa forma, quando há aumento acentuado nos níveis séricos de testosterona, este efeito de *feedback* negativo automático reduz 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 a consequente elevação dos níveis de testosterona. A inibina, hormônio produzido, nos machos, pelas células de Sertoli, também participa desta regulação, propiciando uma retroalimentação negativa da secreção de FSH (SALADIM, 2001; ROSS; ROMRELL, 1993; STANBEFELD; EDQVIST, 1996; NETT, 1993; VALENTI et al., 2013)

Figura 10 – Desenho representativo da regulação hormonal do sistema reprodutor masculino, mostrando o controle endócrino do FSH e LH e o feedback negativo exercido pela testosterona e inibina.



Fonte: Adaptado de FRAIETTA; ZYLBERSTEJN; ESTEVES, 2013.

Assim como no sistema reprodutor feminino, o funcionamento do sistema reprodutor masculino pode ser prejudicado por um desregulador endócrino, durante sua passagem pela barreira hemato-testicular ou por sua 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 hormonal (ZENICK et al., 1994; DALLEGRAVE, 2003; HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2016; ALY et al., 2015).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial tóxico de *K. tomentosa* sobre o sistema reprodutor, órgãos vitais e proles de ratos e ratas Wistar, submetidos a tratamento de curta e longa duração.

3.2 Específicos

- a) Avaliar a toxicidade oral aguda do extrato etanólico das raízes de *Krameria tomentosa* (EEKt) e da sua fração hexânica (FHEEKt) em ratos;
- b) Realizar uma avaliação preliminar do potencial neurotóxico do EEKt e FHEEKt em ratos, após exposição oral aguda;
- c) Investigar a ocorrência de toxicidade do EEKt na morfologia e funcionamento de testículos, epidídimo, vesícula seminal e próstata ventral em ratos, e no útero e ovários em ratas;
- d) Investigar a ocorrência de toxicidade do EEKt em órgãos vitais e sobre o perfil bioquímico, hormonal e hematológico de ratos e ratas;
- e) Avaliar possíveis efeitos adversos do EEKt sobre a prenhez de ratas expostas durante os períodos de pré-implantação, pós-implantação e lactação;
- f) Avaliar o desenvolvimento geral, reflexológico e comportamental das proles.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram realizadas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), no biotério Prof. Thomas George e no Laboratório de Imunologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e sintéticos bioativos (PPgPNSB).

4.2 MATERIAL

4.2.1 Material vegetal

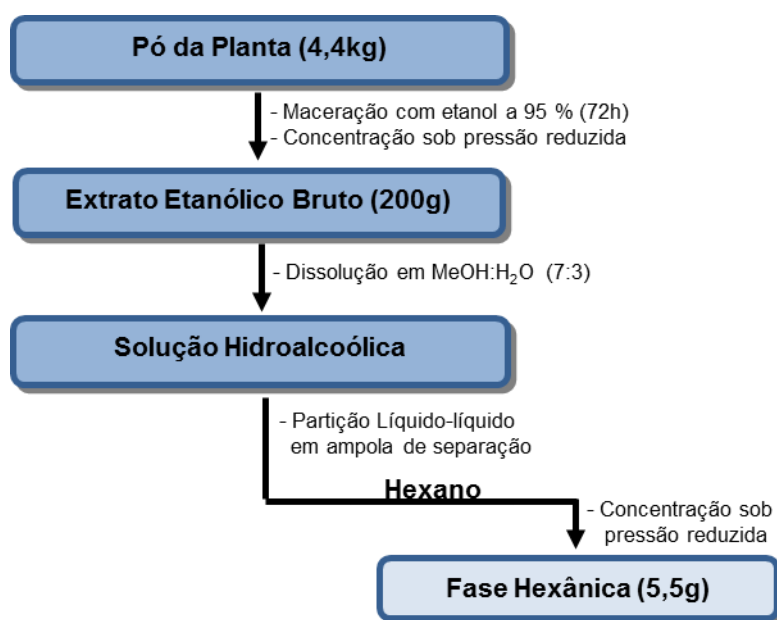
As raízes de *Krameria tomentosa* foram coletadas no município de Santa Rita - PB e sua identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, colaboradora do setor de botânica do PgPNSB. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB, sob código 3271.

O extrato etanólico das raízes de *K. tomentosa* (EEKt) e sua fração hexânica (FHEEKt) foram gentilmente fornecidos pelo Professor Dr. Josean Fachine Tavares, colaborador da fitoquímica do PgPNSB (CCS/UFPB).

O material botânico foi desidratado em estufa com ar circulante, durante 72 horas, a temperatura média de 45 °C. Em seguida, foi reduzido a pó, com auxílio de moinho mecânico, fornecendo 4,4 kg do pó da planta. Este, por sua vez, foi submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95 %, em recipiente de aço inoxidável, por 72 horas. Este processo foi repetido quatro vezes. A solução extrativa obtida foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C, fornecendo 892,0 g de extrato etanólico bruto (EEB) (Figura 13).

Parte deste extrato (200,0 g) foi dissolvido em solução de MeOH:H₂O (7:3) para obtenção de uma solução hidroalcoólica, que foi submetida ao processo de partição líquido-líquido com os solventes hexano, diclorometano (CH₂Cl₂) e acetato de etila (EtOAc). As soluções resultantes foram concentradas, sob pressão reduzida, para o preparo das fases hexânica (5,5 g), diclorometano (11,3 g) e acetato de etila (13,9 g). A fase selecionada para essa pesquisa foi a hexânica, devido à identificação de compostos bioativos como lignanas e neolignanas (DOMINGUEZ, 1990) (Figura 11).

Figura 11 – Esquema do processo de obtenção do EEB de *K. tomentosa* e da sua fase hexânica.



4.2.2 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), adultos, pesando aproximadamente 250 a 300 g (machos) e entre 150 a 250 g (fêmeas, nulíparas e 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 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e em ciclo claro-escuro de 12 horas, sem uso de qualquer medicação e com livre acesso à comida (ração do tipo *pellets* da marca Purina®) e água potável. Todos os cuidados foram considerados no sentido de diminuir a dor e o sofrimento dos animais, seguindo os princípios de cuidados com animais, segundo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPB, certidão número 0711/11 (ANEXO A).

4.2.3 Substâncias

- ✓ Água destilada (UFPB – Brasil);
- ✓ Cloridrato de cetamina (Bio Chimico – Brasil);
- ✓ Cloridrato de xilazina (Syntec – Brasil);
- ✓ Kits para análise hormonal de progesterona e testosterona (Abbott – EUA);
- ✓ Kits para análises bioquímicas (glicose, ureia, creatinina, transaminases, colesterol, triglicerídios, ácido úrico, proteínas totais, amilase e albumina) (Bioclin – Brasil);
- ✓ Tubos à vácuo com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) para análises hematológicas (Vacuplast – Brasil);
- ✓ Tubos com gel separador para análises bioquímicas (Vacuplast – Brasil);
- ✓ Tween 80 (Sigma Aldrich – EUA);

4.2.4 Aparelhagem

- ✓ Analisador bioquímico automático – Axsym (Syslab – Brasil);
- ✓ Analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic System – EUA);
- ✓ Analisador hematológico celular automático – Animal Blood Counter Vet (Horiba ABX Diagnostics – Brasil);
- ✓ Aparelho de campo aberto – modelo EP 154 (Insight – Brasil);
- ✓ Autoclave vertical ideal clav (Stermax – Brasil);
- ✓ Balança analítica HR – 120g (A&D – Japão);
- ✓ Balança eletrônica AG 200 (GEHAKA – Brasil);
- ✓ Câmara de Neubauer espelhada (New Optics – Brasil);
- ✓ Centrífuga BE 4000 (BIO ENG – Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada CENTRA MP4R (IEC Centra – EUA);
- ✓ Estufa de secagem e esterilização (Deleo – Brasil);
- ✓ Microscópio estereoscópico Wild – M3B (Wild – Canadá);
- ✓ Microscópio RML5 (Askmania – Alemanha);

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparação das soluções do EEKt e da FHEEKt

O EEKt e a FHEEKt foram solubilizados em água destilada e em Tween 80 a 2%, respectivamente, para obtenção das soluções em concentrações adequadas à administração correta das doses, de acordo com os protocolos experimentais.

4.3.2 Avaliação da toxicidade oral aguda do EEKt e da FHEEKt

A toxicidade oral aguda foi realizada conforme as diretrizes do guia OECD-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classe” que determina quatro doses fixas a serem utilizadas no estudo (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg e 2000 mg/kg) e o número de animais por dose (três animais do mesmo sexo, normalmente rata) (OECD, 2001).

Neste experimento, a dose inicial selecionada foi de 300 mg/kg, por serem desconhecidas informações acerca da DL_{50} para o EEKt e para a FHEEKt, como preconizado no referido guia. A próxima dose estabelecida foi de 2000 mg/kg, de acordo com a mortalidade observada nas primeiras 24 horas de exposição e durante 14 dias de avaliação. Cada dose foi testada duas vezes (T1 e T2), para posterior estimativa da DL_{50} , conforme os padrões da *Globally Harmonised System* (GHS) (ANEXO B).

O EEKt ou a FHEEKt foram administrados por via oral (gavagem), em dose única, a ratas Wistar. As ratas foram distribuídas nos grupos que receberam as doses de 300 ou 2000 mg/kg do extrato e da fração e nos grupos controles (n=3). Os grupos controles dos animais tratados com o EEKt e com a FHEEKt receberam água destilada e uma solução de Tween 80 a 2%, respectivamente.

Para os ensaios de toxicidade oral aguda, os animais foram submetidos a jejum de 12h, anteriormente a administração do EEKt e da FHEEKt, mas com livre acesso à água. A alimentação foi permitida 3 a 4 horas após o tratamento. Durante o período experimental, os animais foram examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos, incluindo a postura, a ocorrência de convulsões, tremores, consistência e

aspecto das fezes, piloereção, estresse, salivação, lacrimação e comportamento. Estes parâmetros foram avaliados 15min, 30min, 1h, 2h, 4h e 8h, 12h e 24h após a administração, e daí em diante, todos os dias, até o décimo quarto dia, para a análise de possíveis efeitos neurotóxicos (CUNHA et al., 2009). Uma hora após a administração, os animais foram avaliados quanto à função comportamental, motora e sensorial. O peso dos animais foi verificado no dia da administração, no 7º e no 14º dia pós-administração (SACHETTI, 2010).

No 14º dia, os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g [8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL)], conforme protocolo da *Cornell Center for Animal Resources and Education* (CARE), descrito por Flecknell (1996) e Kohn e colaboradores (1997), e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Após laparotomia, foram realizadas análises macroscópicas (aspecto, coloração e tamanho) dos órgãos vitais (pulmões, coração, fígado, rins e cérebro) e órgãos reprodutores (útero e ovários). Estes órgãos foram pesados para determinação de seus pesos relativos (peso do órgão por 100 g de peso corpóreo) (CUNHA et al., 2009).

4.3.3 Ensaios de toxicidade reprodutiva de ratos e ratas Wistar expostos ao EEKt

4.3.3.1 Determinação das doses e distribuição dos grupos

A determinação das doses para os ensaios de toxicidade reprodutiva foi baseada nos resultados obtidos no ensaio de toxicidade oral aguda (estimativa da DL_{50}). Foi também seguida a resolução RE 90/2004, contendo o Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, e o Guia da ANVISA para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Este guia recomenda que no estudo de toxicidade de doses repetidas de um fitoterápico devem ser calculadas três doses, espaçadas geometricamente, sendo que 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 (Brasil, 2004, 2010).

Os experimentos envolveram a exposição oral de ratos e ratas Wistar ao EEKt. Para cada protocolo experimental, foram formados quatro grupos de 12 animais cada: três tratados com o EEKt (T1, T2 e T3) e um grupo controle (C), que recebeu água destilada. Os tratamentos dos animais com as doses estabelecidas foram realizados como mostrado abaixo:

- ✓ Grupo C: animais tratados com água destilada, sendo o volume equivalente a 10 mL/kg de peso corporal;
- ✓ Grupo T1: animais tratados com dose diária de 125 mg/kg de peso corporal, equivalente à menor dose, obtida por progressão geométrica, em relação à maior dose selecionada, estimada a partir do teste de toxicidade oral aguda;
- ✓ Grupo T2: animais tratados com a dose diária de 500 mg/kg de peso corporal, equivalente a uma dose intermediária, obtida pela média geométrica da maior e menor dose;
- ✓ Grupo T3: animais tratados com dose diária de 2000 mg/kg do EEKt, equivalente a maior dose testada, estimada a partir dos resultados do teste de toxicidade oral aguda.

4.3.3.2 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

O sistema de acasalamento nesse estudo foi do tipo poligâmico. Durante o ciclo escuro, na gaiola individual de cada macho, foram colocadas duas fêmeas virgens em estro (período de maior receptividade sexual, quando ocorre a ovulação), onde permaneceram durante toda a noite. Na manhã seguinte ao acasalamento, os animais foram separados e reconduzidos às suas gaiolas de origem (ZENICK; CLEGG, 1994; CASTRO; MELO; MELLO, 2005).

Para a determinação da prenhez, a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e a presença de tampão vaginal foram tomadas como indicativo de inseminação e considerado o dia zero da gestação (CANTARUTTI, 2005; MÜLLER, 2007). 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 óptica.

Os acasalamentos foram repetidos, diariamente, até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para cada protocolo realizado. As ratas prenhas foram mantidas isoladas, para acompanhamento de suas gestações (SÁ, 2003, MELLO et al., 2004).

4.3.3.3 Avaliação da fertilidade e da capacidade reprodutiva de ratos

Os experimentos foram realizados a partir de adaptações de protocolos experimentais e de recomendações sugeridas por órgãos internacionais, como o *Food and Drug Administration* (FDA, 2001), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 1995) e *Environmental Protection Agency* (US EPA, 1996), que avaliam efeitos reprodutivos e de desenvolvimento, mediados por alterações nas vias estrogênica, androgênica e tireoidiana. Foram também seguidas as orientações da ANVISA, através da 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 foram divididos em quatro grupos (n=12), sendo três tratados com o EEKt (T1, T2 e T3), e um controle (C).

Os animais foram tratados diariamente por 52 dias consecutivos e no 45º dia de tratamento, cada animal foi acasalado com fêmeas virgens não tratadas (n=24/grupo). No 53º dia, 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 abaixo.

4.3.3.3.1 Parâmetros avaliados nos machos

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 ocorrência de mortes.

✓ Ganho de massa corporal (g)

Os pesos dos animais foram registrados no primeiro dia das administrações do EEKt, uma vez por semana e no dia da eutanásia. Para a elaboração da curva de evolução ponderal, foram utilizadas as médias diárias dos pesos dos animais de cada grupo.

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

Os animais tiveram livre acesso às mamadeiras com água e o seu consumo foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento, enquanto os registros foram feitos no dia posterior, para obtenção do volume de água ingerido pelo animal. O alimento fornecido foi ração do tipo pellets e o consumo diário foi registrado pela diferença entre uma quantidade pré-estabelecida de ração colocada em um dia e o que restou no dia seguinte.

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

✓ Parâmetros sanguíneos: hematológicos, bioquímicos e hormonais

Após os 52 dias de experimentação, os animais foram submetidos a jejum de 12h. Ao 53º, foram anestesiados para coleta de sangue proveniente do plexo braquial, seguido da preparação para análise hematológica e bioquímica. No primeiro processamento, o sangue foi colocado em tubos devidamente identificados, contendo anticoagulante (EDTA), enquanto no segundo, o sangue coletado foi centrifugado em tubos, contendo gel separador (Microtiner Becton Dickson), para obtenção de amostras de soro, com o intuito de proceder às determinações bioquímicas e hormonais.

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). Na 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, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e triglicerídeos;
- ✓ Cinético – aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT);
- ✓ Biureto – albumina e proteínas totais.

c. Dosagem hormonal

A dosagem sérica de testosterona plasmática foi determinada pelo método de reação enzimática por micropartículas, utilizando-se o analisador bioquímico Axsym.

✓ 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 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).

4.3.3.2 Parâmetros avaliados nas fêmeas 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=24 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 12 animais. 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 $[(\text{corpos lúteos} - \text{implantações}) / \text{corpos lúteos}] \times 100$;
- ✓ Índice de implantação $[(\text{implantações totais}) / \text{corpos lúteos}] \times 100$;
- ✓ Ocorrência de malformações externas.

No grupo 2, as 12 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 (%) = $(\text{nº de filhotes nascidos vivos} / \text{nº de filhotes nascidos}) \times 100$;
- ✓ Índice de viabilidade (%) = $(\text{nº de filhotes vivos no 4º dia pós-natal} / \text{nº de filhotes nascidos vivos}) \times 100$;
- ✓ Índice de desmame (%) = $(\text{nº de filhotes vivos no desmame} / \text{nº de filhotes nascidos vivos}) \times 100$;
- ✓ Razão sexual = $\text{nº de filhotes machos} / \text{nº de filhotes fêmeas}$;
- ✓ Índice de perda pós-implantação = $(\text{nº de implantes} - \text{nº de filhotes vivos} / \text{nº de implantes}) \times 100$;
- ✓ Ocorrência de malformações externas grosseiras.

4.3.3.4 Avaliação da fertilidade e da capacidade reprodutiva de ratas

Esses experimentos, assim como aqueles que avaliaram a fertilidade e capacidade reprodutiva de ratos, obedeceram aos critérios estabelecidos pela ANVISA através do Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, em conformidade com a portaria

de nº 116/MS/SNSV/1996, além das orientações sugeridas pelas agências internacionais – FDA e EPA (FDA, 2001; OECD, 1995; BRASIL, 1996).

As ratas que apresentaram espermatozoides no esfregaço vaginal foram mantidas em gaiolas coletivas, com no máximo quatro animais. A diferenciação dos animais nas caixas foi feita pela marcação de suas caudas com pincel atômico. A avaliação das progenitoras consistiu em dois experimentos, conforme descrito a baixo:

- ✓ Período de pré-implantação – os animais foram tratados a partir do 1º até o 7º dia de prenhez (D7), e eutanasiados no 8º dia (D8) para a análise.
- ✓ Período de pós-implantação – os animais foram tratados durante a prenhez – a partir do 8º dia de prenhez (D8) – e lactação. No entanto, no 18º dia de prenhez (D18), as progenitoras foram separadas e mantidas em gaiolas individuais até o parto e durante toda a lactação, com posterior eutanásia no 22º dia pós-natal (dpn22).

4.3.3.4.1 Exposição no período de pré-implantação

Neste experimento, ratas prenhas foram divididas em quatro grupos (n=12), sendo três tratadas com o EEKt (T1, T2 e T3), e um controle (C). O tratamento foi realizado do primeiro (d1) ao sétimo (d7) dia de prenhez, compreendendo a fase de pré-implantação embrionária em ratos, que acontece cinco a seis dias após a fecundação (BERNARDI, 2002).

Durante este período, os animais foram acompanhados para avaliação e registro dos seguintes parâmetros, conforme metodologia já descrita no subitem 4.3.3.3.1 (ZENICK; CLEGG, 1994; ALMEIDA; MELO; XAVIER, 2000; ROCHA, 2013):

- ✓ Sinais gerais de toxicidade
- ✓ Peso corporal;
- ✓ Consumo diário de água (mL) e ração (g);

No 8º dia de prenhez (d8), as fêmeas foram anestesiadas com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g e eutanasiadas por deslocamento cervical para posterior observação e registro das seguintes variáveis, conforme metodologia descrita nos subitens 4.3.3.3.1 e 4.3.3.3.2:

- ✓ Parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- ✓ Dosagem hormonal, onde a progesterona plasmática foi dosada pelo método de reação enzimática por micropartículas, com utilização de amostras do soro. Utilizou-se o analisador bioquímico automático Axsym.
- ✓ Análise macroscópica dos órgãos vitais e reprodutores (útero e ovários);

Procedeu-se à avaliação dos índices de fertilidade e reprodução, a saber:

- ✓ Número total de embriões implantados;
- ✓ Número de reabsorções e de corpos lúteos;
- ✓ Índices de acasalamento;
- ✓ Índice de gestação;
- ✓ Índice de perda pré-implantação;
- ✓ Índice de implantação;
- ✓ Ocorrência de malformações grosseiras externas;

4.3.3.4.2 Exposição no período de prenhez (pós-implantação) e lactação

Neste experimento, 48 fêmeas com inseminação confirmada foram divididas em quatro grupos (n=12), sendo três tratados com o EEKt (T1, T2 e T3) e um controle (C). O tratamento foi iniciado no 8º dia de prenhez (d8), para evitar a interferência do extrato durante o período de pré-implantação, e continuou durante todo o período gestacional (d21) e lactacional, compreendendo 21 dias pós-natal (dpn21) (BERNARDI et al., 2002).

No 18º dia de prenhez (d18), as fêmeas foram separadas e mantidas isoladas até o parto. As primeiras 24h pós-parto foram consideradas o 1º dia pós-natal

(dpn1) da prole, quando foi feita a sexagem dos filhotes, para verificação do número de machos e fêmeas nascidos. Essa constatação foi feita pela visualização da distância ano-genital, sendo esta maior nos machos, quando comparada com as fêmeas. Os filhotes foram desmamados no 21º dia pós-natal (dpn21), e neste dia as progenitoras foram separadas de seus filhotes para serem anestesiadas no dia seguinte, correspondente ao 22º dia pós-natal (dpn22), com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g e eutanasiadas por deslocamento cervical. As ratas que não pariram até o 25º dia de gestação foram eutanasiadas, com utilização do mesmo procedimento anterior, para avaliação da presença de reabsorções (BERNARDI, 2002).

Durante a prenhez e a lactação, as seguintes variáveis foram avaliadas, seguindo a recomendação da EPA (1996), cuja metodologia já foi descrita anteriormente no subitem 4.3.3.3.1:

- ✓ Sinais gerais de toxicidade;
- ✓ Peso corporal;
- ✓ Consumo diário de água (mL) e ração (g);
- ✓ Peso relativo (%) e análise macroscópica dos órgãos;
- ✓ Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Para avaliação dos parâmetros relativos à prenhez e à lactação, os seguintes índices reprodutivos foram avaliados, conforme descrito no subitem 4.3.3.3.2:

- ✓ Número total de nascimentos;
- ✓ Número total de animais desmamados;
- ✓ Número de implantes;
- ✓ Número de reabsorções;
- ✓ Número de machos e fêmeas nascidos e desmamados;
- ✓ Razão sexual;

- ✓ Índice de nascimento,
- ✓ Índice de viabilidade,
- ✓ Índice de perda pós-implantação;
- ✓ Índice de gestação;
- ✓ Índice de desmame (%) = $(\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos no desmame} / \text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}) \times 100$
- ✓ Ocorrência de malformações.

4.3.4 Parâmetros avaliados na progênie

Os animais provenientes do acasalamento de ratos machos tratados com fêmeas não tratadas e do acasalamento de fêmeas tratadas com machos não tratados foram avaliados durante todo o período lactacional (dpn21 ao dpn35), quanto ao seu desenvolvimento geral, desenvolvimento reflexológico e avaliação comportamental, conforme descrito a seguir (MÜLLER, 2007; FARIA et al., 2008):

a. Desenvolvimento geral

- ✓ Análise macroscópica externa: as proles foram avaliadas quanto aos possíveis efeitos teratogênicos do EEKt sobre 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, foi realizada a observação dos animais 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 pêlos. As observações foram

realizadas até a constatação de pêlos 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 feita 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 tal característica.

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 para medição do tempo gasto para o retorno à posição normal em até um minuto (decúbito ventral).
- ✓ Andar adulto: a partir do 8º dpn, a prole foi avaliada para determinação do andar adulto, isto é, o dia em que o animal iniciou a ambulação sem arrastar os membros posteriores 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 30º, de superfície áspera, com a cabeça no sentido descendente. O reflexo foi considerado formado quando o animal foi capaz de girar aproximadamente 180º e reorientar-se em até 1 minuto.

c. Análise comportamental

- ✓ Teste do campo aberto: quando os animais atingiram o 30º dia (dpn), 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 (“grooming”), ato de levantar os membros anteriores (“rearing”) e número de bolos fecais. A observação de aumento ou diminuição do comportamento exploratório dos animais foi utilizado como parâmetro indicativo de efeitos estimulante ou sedativo do EEKt. Os animais foram observados por um período de 3 minutos (CARLINI et al., 1986; SÁ et al., 2013).

4.3.5 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” ou “two-way”. As diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Bonferroni. As variáveis indicadas como índices ou percentuais foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado e pelo teste exato de Fisher. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

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

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da toxicidade oral aguda em ratos wistar submetidos à administração do extrato etanólico e da fração hexânica de *Krameria tomentosa*

5.1.1 Parâmetros gerais

Na dose de 300 mg/kg, nenhum dos três animais expostos ao EEKt ou à FHEEKt apresentaram mortalidade ou morbidade nas primeiras 24 horas após a exposição e durante os 14 dias de avaliação. Posteriormente, este teste foi repetido com outros três animais, utilizando-se a mesma dose, confirmando o primeiro resultado. Em seguida, realizou-se o teste na dose de 2000 mg/kg e também não foi registrada nenhuma morte ou morbidade. Esse resultado foi confirmado com a repetição do teste para essa mesma dose.

Durante a triagem toxicológica (*screening* hipocrático), não foram observados sinais clínicos de toxicidade, tais como piloereção, convulsões ou mortes em nenhum dos grupos tratados com o EEKt ou com a FHEEKt. Não houve alterações de grande relevância das atividades geral e de coordenação motora e muscular, havendo apenas uma leve diminuição na resposta ao pinçamento da cauda dos animais tratados com o EEKt e com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, a partir da 1ª hora de observação (escore 3) (Tabelas 1 e 2). Os parâmetros relacionados às atividades do sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo não foram alterados nos animais tratados com o EEKt ou com a FHEEKt (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Observou-se uma moderada redução dos reflexos auricular e corneal dos animais tratados com o EEKt e com a FHEEKt nas primeiras horas de observação (escore 2), que foi posteriormente normalizada (escore 4) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 1 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (atividades gerais, de coordenação motora e muscular) de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt em dose única.

Parâmetros Avaliados	Grupos	Tempo (h)								Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	12	24	3	7	10	14
Atividade geral	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Resposta ao toque	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Resposta ao pinçamento da cauda	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Endireitamento	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Força para agarrar	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Tônus da pata	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Tônus do corpo	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Score numérico da tabela: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente.

Tabela 2 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (atividades gerais, de coordenação motora e muscular) de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt em dose única.

Parâmetros Avaliados	Grupos	Tempo (h)								Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	12	24	3	7	10	14
Atividade geral	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Resposta ao toque	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Resposta ao pinçamento da cauda	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4
Endireitamento	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Força para agarrar	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Tônus da pata	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Tônus do corpo	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Score numérico da tabela: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente.

Tabela 3 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (reflexos e sistema nervoso central) de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt em dose única.

Parâmetros avaliados	Grupos	Tempo (h)								Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	12	24	3	7	10	14
Reflexo auricular	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4
Tremores	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Score numérico da tabela: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente.

Tabela 4 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (reflexos e sistema nervoso central) de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt em dose única.

Parâmetros Avaliados	Grupos	Tempo (h)								Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	12	24	3	7	10	14
Reflexo auricular	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	2	2	2	2	4	4	4	4	4	4
Tremores	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Score numérico da tabela: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente.

Tabela 5 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (sistema nervoso autônomo) de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt em dose única.

Parâmetros Avaliados	Grupos	Tempo (h)								Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	12	24	3	7	10	14
Lacrimação	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivação	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defecação	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Piloereção	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Score numérico da tabela: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente.

Tabela 6 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático (sistema nervoso autônomo) de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt em dose única.

Parâmetros Avaliados	Grupos	Tempo (h)								Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	12	24	3	7	10	14
Lacrimação	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivação	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defecação	Controle (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	300 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2000 mg/kg (n=6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Piloereção	Controle (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000 mg/kg (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Score numérico da tabela: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente.

Em relação ao consumo de ração, foi observado que a administração do EEKt, na dose de 2000 mg/kg (T1 e T2) e da FHEEKt, nas doses de 300 mg/kg (T2) e 2000 mg/kg (T1 e T2), causou redução significativa desse parâmetro, em comparação ao grupo controle. O consumo de água dos animais tratados com o EEKt, na dose de 2000 mg/kg (T2) e com a FHEEKt, nas doses de 300 mg/kg (T2) e 2000 mg/kg (T1 e T2) sofreu diminuição, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, não foi observada nenhuma redução significativa no ganho de massa corporal dos animais tratados com o EEKt e com a FHEEKt (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – Média dos valores de peso corporal e consumo de água e ração de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

Variáveis	Controle	EEKt			
		T1 300 mg/kg	T2 300 mg/kg	T1 2000 mg/kg	T2 2000 mg/kg
Peso corporal (g)	202,80 ± 11,99	191,00 ± 10,39	202,2 ± 9,50	196,10 ± 4,09	209,70 ± 6,39
Consumo de ração (g)	21,15 ± 0,58	20,61 ± 0,53	22,43 ± 0,55	18,15 ± 0,34***	16,53 ± 0,26***
Consumo de água (g)	35,68 ± 1,24	38,43 ± 1,26	33,79 ± 0,94	37,94 ± 1,57	32,49 ± 0,90*

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram obtidos e analisados por meio do teste “t” de Student, n=3. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 8 – Média dos valores de peso corporal e consumo de água e ração de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

Variáveis	Controle	FHEEKt			
		T1 300 mg/kg	T2 300 mg/kg	T1 2000 mg/kg	T2 2000 mg/kg
Peso corporal (g)	203,50 ± 11,20	199,30 ± 8,40	198,30 ± 6,52	203,00 ± 4,50	187,10 ± 5,57
Consumo de ração (g)	21,77 ± 0,55	20,72 ± 0,55	19,03 ± 0,48***	17,78 ± 0,35***	19,02 ± 0,36***
Consumo de água (mL)	37,60 ± 0,99	38,31 ± 0,59	33,51 ± 0,97**	34,28 ± 0,95*	34,44 ± 1,18*

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram obtidos e analisados por meio do teste “t” de Student, n=3. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os resultados do teste do campo aberto, realizado em ratas tratadas com o EEKt ou com a FHEEKt, mostraram que não houve alterações em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados (ambulação, número de execuções de levantar e de limpeza, e número de bolos fecais), quando comparados ao grupo controle (T1 e T2) (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

EEKt					
Variáveis	Controle	T1	T2	T1	T2
		300 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg	2000 mg/kg
Ambulação	32,33 ± 8,95	26,00 ± 0,58	33,00 ± 8,33	17,33 ± 3,18	18,33 ± 7,54
Levantadas	16,67 ± 3,28	14,33 ± 3,38	12,33 ± 3,18	14,00 ± 1,53	15,00 ± 1,53
Limpeza (s)	9,67 ± 2,40	13,33 ± 1,86	9,00 ± 0,58	8,00 ± 1,15	10,67 ± 0,88
Bolos fecais	3,00 ± 1,53	2,67 ± 1,20	2,00 ± 0,58	2,33 ± 0,33	3,33 ± 0,67

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, n=3.

Tabela 10 – Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

FHEEKt					
Variáveis	Controle	T1	T2	T1	T2
		300 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg	2000 mg/kg
Ambulação	36,00 ± 8,02	37,33 ± 9,50	27,33 ± 1,76	32,33 ± 5,81	22,00 ± 2,52
Levantadas	15,33 ± 5,84	25,33 ± 0,88	19,00 ± 2,08	23,67 ± 6,17	13,33 ± 0,88
Limpeza (s)	7,67 ± 1,45	8,33 ± 2,03	11,33 ± 2,40	9,33 ± 1,45	12,00 ± 0,58
Bolos fecais	2,33 ± 0,88	4,33 ± 1,20	4,00 ± 0,58	1,67 ± 0,67	1,67 ± 0,33

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=3).

Não foi evidenciada qualquer alteração durante a análise macroscópica dos órgãos dos animais tratados com as doses de 300 ou 2000 mg/kg do EEKt e da FHEEKt, considerando-se parâmetros tais como: aspecto, tamanho, cor e forma.

Nenhuma alteração significativa foi observada nos pesos absoluto e relativo de útero, ovários, coração, cérebro e rins dos animais tratados com as doses de 300 ou 2000 mg/kg do EEKt ou da FHEEKt. Houve um aumento significativo no peso absoluto dos pulmões dos animais expostos às doses de 300 ou 2000 mg/kg do EEKt. Porém, o peso relativo desse órgão não divergiu do grupo controle (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 – Peso absoluto de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 mg/kg (T1 e T2) ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

Variáveis	EEKt				
	Controle	T1		T2	
		300 mg/kg	2000 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
Útero	0,33 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,33 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,33 ± 0,02
Ovário direito	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,06 ± 0,01
Ovário esquerdo	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,47	0,06 ± 0,01
Rim direito	0,77 ± 0,07	0,72 ± 0,05	0,71 ± 0,01	0,77 ± 0,08	0,77 ± 0,06
Rim esquerdo	0,77 ± 0,05	0,69 ± 0,05	0,70 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,77 ± 0,06
Fígado	6,52 ± 0,26	5,43 ± 0,25	6,42 ± 0,13	6,64 ± 0,02	6,96 ± 0,26
Pulmões	1,05 ± 0,02	1,42 ± 0,20	1,37 ± 0,10	1,48 ± 0,05*	1,59 ± 0,13**
Coração	0,71 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,75 ± 0,01	0,78 ± 0,05	0,85 ± 0,07
Cérebro	1,05 ± 0,07	1,11 ± 0,03	1,10 ± 0,03	1,10 ± 0,08	1,03 ± 0,09

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni, (n=3). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$.

Tabela 12 – Peso relativo de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt nas doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

Variáveis	EEKt				
	T1		T2		
	Controle	300 mg/kg	2000 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
Peso corporal (g)	202,7 ±15,20	191,0±3,40	196,1±10,90	202,2±6,30	209,7±14,80
Peso relativo (%)					
Útero	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Ovário direito	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Ovário esquerdo	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Rim direito	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01
Rim esquerdo	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,01
Fígado	2,98 ± 0,10	2,63 ± 0,10	3,18 ± 0,22	3,03 ± 0,17	3,17 ± 0,22
Pulmões	0,48 ± 0,03	0,69 ± 0,09	0,68 ± 0,09	0,68 ± 0,02	0,72 ± 0,06
Coração	0,32 ± 0,00	0,34 ± 0,03	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,39 ± 0,05
Cérebro	0,48 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,50 ± 0,04	0,46 ± 0,02

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=3).

Verificou-se também um aumento significativo no peso absoluto do fígado e pulmões dos animais que receberam 2000 mg/kg da FHEEKt, entretanto nenhuma alteração foi observada no peso relativo desses órgãos. Observou-se um aumento no peso relativo dos rins direito (T1) e esquerdo (T2) nos animais que receberam a dose de 300 mg/kg da FHEEKt (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 – Peso absoluto de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

Variáveis	FHEEKt				
	Controle	T1		T2	
		300 mg/kg	2000 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
Útero	0,34 ± 0,07	0,38 ± 0,04	0,24 ± 0,09	0,29 ± 0,03	0,32 ± 0,07
Ovário direito	0,16 ± 0,10	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Ovário esquerdo	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Rim direito	0,72 ± 0,04	0,80 ± 0,08	0,76 ± 0,01	0,82 ± 0,06	0,76 ± 0,04
Rim esquerdo	0,70 ± 0,04	0,80 ± 0,09	0,78 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,73 ± 0,02
Fígado	6,31 ± 0,23	6,80 ± 0,30	7,39 ± 0,70	6,10 ± 0,37	7,73 ± 0,07*
Pulmões	1,13 ± 0,15	2,05 ± 0,43	2,11 ± 0,33	1,16 ± 0,18	1,90 ± 0,08*
Coração	0,75 ± 0,05	0,72 ± 0,09	0,81 ± 0,07	0,67 ± 0,04	0,80 ± 0,03
Cérebro	0,96 ± 0,04	0,95 ± 0,13	1,03 ± 0,06	0,92 ± 0,12	1,03 ± 0,08

Valores expressos em media ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni (n=3). * $p < 0,05$.

Tabela 14 – Peso relativo de órgãos de ratas dos grupos controle e tratados com a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg (T1 e T2).

Variáveis	FHEEKt				
	Controle	T1		T2	
		300 mg/kg	2000 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
Peso corporal (g)	203,5 ± 11,9	199,3 ± 17,9	203,0 ± 1,6	198,3 ± 5,3	187,1 ± 2,4
Peso relativo (%)					
Útero	0,15 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Ovário direito	0,07 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Ovário esquerdo	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Rim direito	0,33 ± 0,01	0,38 ± 0,00*	0,35 ± 0,01	0,39 ± 0,03	0,35 ± 0,01
Rim esquerdo	0,32 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,37 ± 0,00*	0,35 ± 0,01
Fígado	2,90 ± 0,13	3,27 ± 0,20	3,18 ± 0,22	2,92 ± 0,10	3,17 ± 0,22
Pulmões	0,51 ± 0,05	0,71 ± 0,40	0,68 ± 0,09	0,55 ± 0,07	0,72 ± 0,06
Coração	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,39 ± 0,05
Cérebro	0,44 ± 0,03	0,46 ± 0,09	0,54 ± 0,02	0,44 ± 0,07	0,46 ± 0,02

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente (n=3). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=3). * $p < 0,05$.

5.2 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratos e ratas Wistar expostos ao extrato etanólico de *Krameria tomentosa*

5.2.1 Sinais gerais de toxicidade

Durante os procedimentos experimentais em ratos (tratados durante 52 dias) e em ratas avaliadas durante o período de pré-implantação embrionária (do 1º ao 7º dia de prenhez), 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 EEKt.

No período de pós-implantação e lactação (do 8º dia de prenhez ao 21º dia de lactação) foram registrados sinais de toxicidade sistêmica, evidenciados pela ocorrência de diarreia e piloereção, além do registro de três mortes maternas do grupo tratado com a dose de 500 mg/kg do EEKt e duas mortes no grupo tratado com a dose de 2000 mg/kg do extrato.

5.2.2 Evolução ponderal e consumo de água e ração

Os dados obtidos mostram que a administração do EEKt a ratos provocou uma diminuição significativa no peso corporal, evidenciada a partir do 35º dia de tratamento nos grupos tratados com as três doses utilizadas (125, 500 e 2000 mg/kg). Na dose de 2000 mg/kg essa alteração foi evidenciada do 1º ao 52º dia de tratamento (Tabela 15). Em relação ao consumo de ração e de água, o EEKt não causou mudanças entre os grupos controle e tratados com as três doses administradas (Tabelas 19 e 22).

A administração do EEKt a ratas, durante o período de pré-implantação embrionária não alterou a evolução ponderal, nas doses de 125, 500 e 2000 mg/kg (Tabela 16). O consumo de ração e de água foi reduzido nos grupos que receberam as três doses do EEKt, quando comparados ao grupo controle (Tabelas 20 e 23).

A administração do EEKt (125, 500 e 2000 mg/kg) não alterou a evolução ponderal das ratas tratadas no período de pós-implantação, porém causou redução significativa do

peso das ratas durante o período de lactação (Tabelas 17 e 18). O consumo de ração e de água não foi modificado nos grupos que receberam as três doses do EEKt, quando comparado ao grupo controle (Tabelas 21 e 24).

Tabela 15 – Peso dos ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	253,96 ± 12,32	236,70 ± 12,73	259,61 ± 6,37	211,41 ± 9,88*
7	289,54 ± 10,98	275,90 ± 6,49	280,83 ± 7,73	248,17 ± 9,31**
14	317,02 ± 11,91	289,40 ± 7,09	293,42 ± 7,49	266,09 ± 10,43**
21	337,30 ± 12,08	302,88 ± 8,11	307,67 ± 9,00	283,89 ± 10,64**
28	352,08 ± 12,39	316,33 ± 9,94	312,48 ± 8,85*	301,98 ± 10,73**
35	368,07 ± 13,11	323,75 ± 10,55*	325,17 ± 10,49*	313,00 ± 10,34**
42	383,78 ± 14,68	329,86 ± 9,50**	331,50 ± 11,19*	324,18 ± 13,02**
49	394,48 ± 14,37	337,65 ± 10,42**	337,70 ± 11,80**	336,89 ± 11,24**
52	385,18 ± 14,21	334,26 ± 12,31*	319,81 ± 11,51**	323,44 ± 10,22**

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Tabela 16 – Peso das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	242,82 ± 5,99	228,98 ± 6,89	236,07 ± 4,09	255,32 ± 5,93
7	251,49 ± 6,04	237,17 ± 6,97	242,16 ± 4,35	252,14 ± 5,68

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 17 – Peso das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
8	217,59 ± 5,28	201,67 ± 7,28	223,64 ± 9,70	211,14 ± 10,47
14	254,44 ± 6,60	227,41 ± 7,25	238,81 ± 8,29	250,84 ± 9,19
21	297,58 ± 8,48	265,87 ± 11,36	276,58 ± 8,56	278,65 ± 9,61

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 18 – Peso das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de lactação.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	245,00 ± 6,81	218,48 ± 6,07	217,22 ± 6,51	225,81 ± 9,12
7	254,22 ± 6,89	223,21 ± 6,06*	226,65 ± 6,91*	233,50 ± 9,45
14	265,64 ± 7,46	246,99 ± 7,24	242,28 ± 10,13	235,58 ± 8,99*
21	270,45 ± 7,52	241,06 ± 7,22	233,70 ± 11,32*	252,92 ± 10,88

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni (n=12). * $p < 0,05$.

Tabela 19 – Ingestão diária de ração dos ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
7	23,89 ± 0,33	24,44 ± 0,80	23,76 ± 0,48	23,74 ± 0,33
14	23,87 ± 0,24	22,64 ± 0,65	24,52 ± 0,52	24,47 ± 0,32
21	24,45 ± 0,17	23,37 ± 0,22	25,33 ± 0,42	23,66 ± 0,35
28	23,96 ± 0,23	22,77 ± 0,48	24,78 ± 0,18	24,35 ± 0,35
35	24,01 ± 0,31	23,29 ± 0,60	25,02 ± 0,71	23,73 ± 0,52
42	24,07 ± 0,16	23,77 ± 0,57	24,16 ± 0,45	24,65 ± 0,46
45	23,75 ± 0,29	22,64 ± 1,21	22,90 ± 0,69	24,78 ± 0,96

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 20 – Ingestão diária de ração das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	15,37 ± 0,64	15,50 ± 1,64	18,84 ± 1,11	16,73 ± 0,97
2	18,38 ± 0,44	16,90 ± 1,55	19,93 ± 0,95	16,84 ± 0,92
3	20,16 ± 0,14	17,95 ± 1,78	19,55 ± 1,06	15,06 ± 0,53**
4	23,26 ± 0,86	19,31 ± 1,97	20,09 ± 0,99	16,49 ± 0,28***
5	24,50 ± 0,96	18,87 ± 1,95**	19,23 ± 0,78**	18,59 ± 0,60**
6	26,40 ± 1,10	19,95 ± 1,82***	19,43 ± 0,62***	19,55 ± 0,56***

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 21 – Ingestão diária de ração das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
7	33,58 ± 4,32	30,95 ± 3,86	31,47 ± 3,56	31,83 ± 3,56
14	56,58 ± 2,39	53,55 ± 3,14	56,27 ± 2,31	53,69 ± 2,31
21	65,75 ± 1,91	61,91 ± 1,98	66,10 ± 1,64	61,03 ± 1,01

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 22 – Consumo de água dos ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
7	42,04 ± 1,07	42,94 ± 2,24	41,07 ± 1,33	41,65 ± 0,59
14	42,85 ± 0,85	43,74 ± 1,90	43,62 ± 0,81	41,21 ± 1,10
21	43,03 ± 0,41	44,73 ± 1,34	42,40 ± 1,52	41,96 ± 0,65
28	42,48 ± 0,62	40,91 ± 1,28	43,17 ± 0,68	43,35 ± 0,89
35	39,64 ± 0,58	39,84 ± 1,59	39,26 ± 0,98	39,82 ± 1,03
42	40,43 ± 0,54	40,31 ± 1,09	40,31 ± 0,53	40,67 ± 0,53
45	37,12 ± 0,31	35,80 ± 0,67	37,01 ± 0,55	38,54 ± 1,85

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 23 – Consumo de água das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	38,38 ± 0,36	29,33 ± 1,16**	40,08 ± 3,09	33,29 ± 1,15
2	40,88 ± 0,50	31,31 ± 0,53***	40,73 ± 2,69	32,81 ± 1,26**
3	44,88 ± 1,36	35,23 ± 1,75**	39,33 ± 2,80	36,19 ± 2,03*
4	46,66 ± 1,47	37,67 ± 1,74**	41,90 ± 2,39	36,60 ± 1,68**
5	50,50 ± 2,72	34,98 ± 1,48***	41,06 ± 2,59**	35,13 ± 1,22***
6	51,63 ± 2,89	38,13 ± 1,35***	41,65 ± 2,37**	35,79 ± 0,91***

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n = 12). * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 24 – Consumo de água das ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
7	78,04 ± 5,83	71,85 ± 4,40	68,37 ± 6,93	73,38 ± 3,41
14	102,70 ± 2,29	95,56 ± 2,48	101,80 ± 3,73	95,09 ± 2,30
21	122,20 ± 3,13	113,80 ± 5,89	118,10 ± 4,73	109,70 ± 4,07

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

5.2.3 Parâmetros sanguíneos hematológicos, bioquímicos e hormonal

O perfil bioquímico de ratos não foi modificado pela administração oral do EEKt, nas doses de 125, 500 e 2000 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (Tabela 25). Os parâmetros hematológicos também não mostraram diferenças significativas entre os grupos controle e tratados com o EEKt (Tabela 28). A concentração de testosterona sérica (ng/mL) não foi significativamente alterada nos ratos que receberam o EEKt nas doses de 125 mg/kg ($4,76 \pm 1,2$), 500 mg/kg ($2,88 \pm 0,84$) e 2000 mg/kg ($3,30 \pm 0,88$), em relação ao grupo controle ($2,80 \pm 0,65$) (Figura 12).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos das ratas tratadas durante o período de pré-implantação embrionária não foram alterados pela administração oral do EEKt, nas doses de 125, 500 e 2000 mg/kg, quando comparados ao grupo controle (Tabelas 26 e 29). A dosagem sérica de progesterona (ng/mL) não foi modificada de forma significativa nas ratas que receberam o EEKt nas doses de 125 mg/kg ($34,68 \pm 3,43$), 500 mg/kg ($36,20 \pm 3,87$) e 2000 mg/kg ($38,13 \pm 2,92$), em relação ao grupo controle ($46,49 \pm 2,18$) (Figura 13).

A administração do EEKt no período de pós-implantação e lactação na dose de 125 mg/kg não causou qualquer alteração nos parâmetros bioquímicos das ratas, mas nas doses de 500 mg/kg e 2000 mg/kg, foi observada uma redução significativa dos níveis séricos de LDL, quando comparado ao grupo controle (Tabela 27). O perfil hematológico manteve-se normal nas ratas que receberam as diferentes doses do EEKt (Tabela 30).

Tabela 25 – Perfil bioquímico de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.

Parâmetros bioquímicos	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	130,30 ± 6,54	126,83 ± 5,25	138,50 ± 5,60	141,92 ± 4,19
Colesterol (mg/dL)	55,72 ± 2,68	47,97 ± 1,52	54,25 ± 3,31	41,10 ± 2,28
Triglicerídeos (mg/dL)	90,25 ± 4,03	79,42 ± 4,65	76,25 ± 4,58	76,33 ± 6,74
Ácido úrico (mg/dL)	2,28 ± 0,36	1,69 ± 0,17	1,86 ± 0,34	2,45 ± 0,39
Ureia (mg/dL)	40,15 ± 2,34	45,22 ± 3,41	47,62 ± 2,17	39,50 ± 1,32
Creatinina (mg/dL)	0,72 ± 0,03	0,60 ± 0,01	0,69 ± 0,03	0,69 ± 0,04
HDL(mg/dL)	29,25 ± 2,73	23,42 ± 1,1	31,33 ± 2,67	25,75 ± 1,41
LDL (mg/dL)	8,42 ± 0,31	8,66 ± 0,33	7,67 ± 0,28	8,08 ± 0,38
VLDL (mg/dL)	18,05 ± 0,81	15,88 ± 0,93	15,25 ± 0,92	15,27 ± 1,35
ALT (U/L)	38,55 ± 2,36	39,89 ± 3,61	48,13 ± 4,05	43,25 ± 3,21
AST (U/L)	127,23 ± 7,35	122,59 ± 6,94	132,40 ± 6,85	133,00 ± 10,06
Amilase (U/L)	478,93 ± 19,08	474,14 ± 13,66	522,34 ± 12,19	499,21 ± 31,16
Albumina (g/dL)	3,23 ± 0,09	3,10 ± 0,10	3,21 ± 0,10	3,31 ± 0,15

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni,(n=12).

Tabela 26 – Perfil bioquímico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.

Parâmetros bioquímicos	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	93,42 ± 4,15	103,58 ± 4,24	91,61 ± 3,85	99,55 ± 5,23
Colesterol (mg/dL)	67,42 ± 2,96	62,08 ± 2,64	72,54 ± 2,14	71,64 ± 1,86
Triglicerídeos (mg/dL)	71,92 ± 3,98	67,25 ± 2,64	82,18 ± 2,69	76,81 ± 3,21
Ácido úrico (mg/dL)	4,61 ± 0,63	3,53 ± 0,54	6,04 ± 0,74	2,93 ± 0,27
Ureia (mg/dL)	53,08 ± 2,34	53,33 ± 2,69	57,73 ± 2,51	41,09 ± 1,68
Creatinina (mg/dL)	1,00 ± 0,13	1,10 ± 0,18	0,92 ± 0,15	0,70 ± 0,01
HDL(mg/dL)	30,67 ± 1,30	27,50 ± 1,68	32,21 ± 1,00	31,27 ± 1,49
LDL (mg/dL)	22,33 ± 2,11	21,17 ± 1,54	23,89 ± 1,51	25,00 ± 1,22
VLDL (mg/dL)	14,42 ± 0,77	13,42 ± 0,61	16,44 ± 0,54	15,36 ± 0,64
ALT (U/L)	64,00 ± 2,30	58,83 ± 3,48	70,00 ± 3,08	63,27 ± 2,44
AST (U/L)	157,08 ± 7,58	158,42 ± 8,57	177,74 ± 5,60	159,91 ± 8,11
Amilase (U/L)	487,75 ± 20,06	525,33 ± 15,35	533,68 ± 27,70	511,82 ± 17,85
Proteína total (g/dL)	2,81 ± 0,19	3,08 ± 0,27	3,12 ± 0,28	2,27 ± 0,12
Globulina (mg/dL)	5,89 ± 0,53	6,66 ± 0,93	6,78 ± 0,81	4,42 ± 0,43
Albumina (g/dL)	3,10 ± 0,35	3,58 ± 0,67	3,65 ± 0,54	2,15 ± 0,33

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni,(n=12).

Tabela 27 – Perfil bioquímico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.

Parâmetros bioquímicos	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	104,25 ± 2,87	103,42 ± 8,80	101,94 ± 2,56	110,91 ± 4,07
Colesterol (mg/dL)	82,75 ± 2,19	77,42 ± 2,39	71,97 ± 1,75	73,54 ± 2,65
Triglicerídeos (mg/dL)	84,17 ± 2,45	77,08 ± 3,40	82,19 ± 3,26	73,22 ± 4,48
Ácido úrico (mg/dL)	2,31 ± 0,36	3,23 ± 0,40	3,19 ± 0,54	3,51 ± 0,65
Ureia (mg/dL)	54,67 ± 2,01	65,17 ± 3,98	61,43 ± 5,23	56,13 ± 4,69
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,04	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,03
HDL(mg/dL)	35,92 ± 1,05	34,25 ± 1,42	32,71 ± 1,11	33,66 ± 1,43
LDL (mg/dL)	30,00 ± 1,19	27,75 ± 1,21	22,82 ± 1,20**	24,16 ± 1,43*
VLDL (mg/dL)	16,83 ± 0,49	15,42 ± 0,68	16,44 ± 0,65	15,72 ± 0,63
ALT (U/L)	81,50 ± 3,14	76,92 ± 3,07	82,06 ± 3,82	74,19 ± 7,65
AST (U/L)	166,83 ± 7,72	171,67 ± 5,82	168,21 ± 9,64	174,44 ± 5,32
Amilase (U/L)	547,08 ± 31,83	516,42 ± 22,20	486,84 ± 23,34	559,84 ± 27,97
Proteína total (g/dL)	2,32 ± 0,09	2,72 ± 0,10	2,47 ± 0,10	2,23 ± 0,13
Globulina (mg/dL)	4,68 ± 0,21	5,88 ± 0,24	5,60 ± 0,33	5,10 ± 0,27
Albumina (g/dL)	2,36 ± 0,13	3,18 ± 0,15	3,12 ± 0,25	2,87 ± 0,19

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente (n=12). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido do pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Tabela 28 – Perfil hematológico de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.

Parâmetros hematológicos	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,42 $\pm$ 0,22	9,14 $\pm$ 0,22	8,85 $\pm$ 0,30	8,19 $\pm$ 0,21
Hemoglobina (g/dL)	15,13 $\pm$ 0,21	15,48 $\pm$ 0,23	15,70 $\pm$ 0,26	15,82 $\pm$ 0,22
Hematócrito (%)	43,88 $\pm$ 1,36	45,60 $\pm$ 1,23	45,68 $\pm$ 1,16	44,79 $\pm$ 1,25
VCM (fL)	52,67 $\pm$ 0,95	49,92 $\pm$ 0,88	51,75 $\pm$ 0,63	54,83 $\pm$ 0,72
HCM (pg)	18,28 $\pm$ 0,52	17,03 $\pm$ 0,43	17,90 $\pm$ 0,47	19,43 $\pm$ 0,41
CHCM (g/dL)	34,80 $\pm$ 1,02	34,13 $\pm$ 0,79	34,48 $\pm$ 0,59	35,51 $\pm$ 0,78
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,27 $\pm$ 0,45	4,93 $\pm$ 0,58	3,92 $\pm$ 0,41	4,53 $\pm$ 0,33
Neutrófilos (segmentados) (%)	18,67 $\pm$ 1,88	22,92 $\pm$ 3,10	23,08 $\pm$ 1,83	21,33 $\pm$ 2,04
Basófilos (%)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,08	0,00 $\pm$ 0,00
Eosinófilos (%)	0,67 $\pm$ 0,22	0,17 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,18	0,42 $\pm$ 0,19
Linfócitos (%)	74,33 $\pm$ 2,34	72,00 $\pm$ 3,23	71,75 $\pm$ 1,91	73,00 $\pm$ 2,24
Monócitos (%)	5,50 $\pm$ 0,73	4,92 $\pm$ 0,67	4,92 $\pm$ 0,90	5,25 $\pm$ 0,68
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	722,83 $\pm$ 15,40	622,67 $\pm$ 32,13	751,25 $\pm$ 26,15	767,25 $\pm$ 28,05

Valores expressos em média $\pm$ e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 29 – Perfil hematológico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.

Parâmetros hematológicos	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,40 $\pm$ 0,19	7,23 $\pm$ 0,24	7,92 $\pm$ 0,19	7,93 $\pm$ 0,16
Hemoglobina (g/dL)	13,61 $\pm$ 0,24	13,68 $\pm$ 0,25	14,43 $\pm$ 0,28	14,58 $\pm$ 0,20
Hematócrito (%)	37,78 $\pm$ 0,95	38,43 $\pm$ 1,24	40,59 $\pm$ 0,92	41,62 $\pm$ 0,85
VCM (fL)	51,12 $\pm$ 0,50	53,33 $\pm$ 1,16	51,14 $\pm$ 0,52	52,42 $\pm$ 0,47
HCM (pg)	18,45 $\pm$ 0,35	19,10 $\pm$ 0,44	18,23 $\pm$ 0,41	18,44 $\pm$ 0,41
CHCM (g/dL)	36,11 $\pm$ 0,58	35,85 $\pm$ 0,74	35,58 $\pm$ 0,54	35,13 $\pm$ 0,64
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,35 $\pm$ 0,61	4,83 $\pm$ 0,69	6,52 $\pm$ 0,79	6,00 $\pm$ 0,65
Neutrófilos (segmentados) (%)	24,92 $\pm$ 2,45	29,58 $\pm$ 2,39	28,00 $\pm$ 2,23	29,67 $\pm$ 3,49
Basófilos (%)	0,08 $\pm$ 0,08	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Eosinófilos (%)	1,25 $\pm$ 0,35	1,25 $\pm$ 0,55	0,92 $\pm$ 0,29	0,50 $\pm$ 0,29
Linfócitos (%)	69,08 $\pm$ 2,57	65,42 $\pm$ 2,26	67,75 $\pm$ 2,50	66,25 $\pm$ 3,49
Monócitos (%)	4,67 $\pm$ 0,45	3,75 $\pm$ 0,75	5,08 $\pm$ 0,50	3,58 $\pm$ 0,56
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	724,75 $\pm$ 41,22	682,92 $\pm$ 41,00	679,00 $\pm$ 27,12	746,00 $\pm$ 38,00

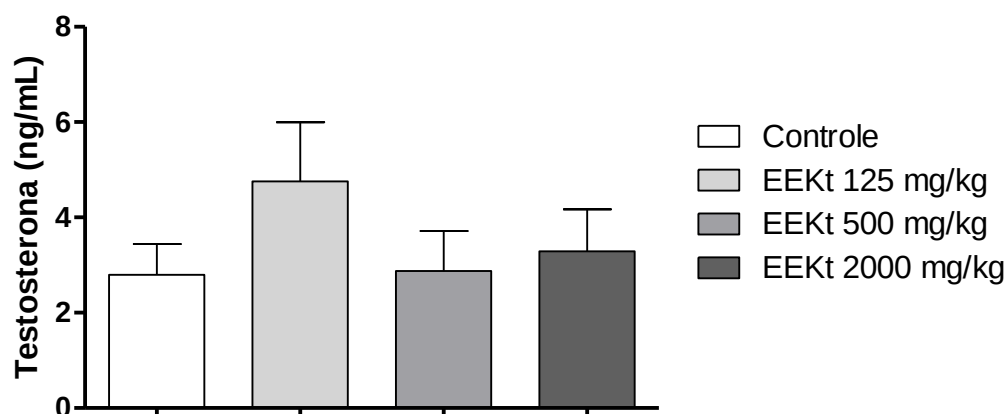
Valores expressos em média $\pm$ e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 30 – Perfil hematológico de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.

Parâmetros hematológicos	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,15 $\pm$ 0,09	7,83 $\pm$ 0,23	7,53 $\pm$ 0,17	7,66 $\pm$ 0,17
Hemoglobina (g/dL)	13,02 $\pm$ 0,25	15,38 $\pm$ 0,38	14,26 $\pm$ 0,43	13,40 $\pm$ 0,36
Hematócrito (%)	36,86 $\pm$ 0,80	42,16 $\pm$ 1,32	39,74 $\pm$ 0,98	39,49 $\pm$ 0,83
VCM (fL)	51,55 $\pm$ 0,63	53,95 $\pm$ 0,54	52,84 $\pm$ 0,58	51,57 $\pm$ 0,49
HCM (pg)	18,27 $\pm$ 0,38	19,73 $\pm$ 0,50	18,98 $\pm$ 0,44	17,53 $\pm$ 0,36
CHCM (g/dL)	35,50 $\pm$ 0,78	36,67 $\pm$ 0,84	35,90 $\pm$ 0,64	33,94 $\pm$ 0,55
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,28 $\pm$ 0,47	5,89 $\pm$ 0,82	7,03 $\pm$ 0,84	5,23 $\pm$ 0,88
Neutrófilos (segmentados) (%)	38,25 $\pm$ 3,32	39,17 $\pm$ 4,03	34,60 $\pm$ 3,95	38,64 $\pm$ 5,33
Basófilos (%)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,10	0,00 $\pm$ 0,00
Eosinófilos (%)	0,17 $\pm$ 0,11	0,50 $\pm$ 0,26	0,10 $\pm$ 0,10	0,73 $\pm$ 0,30
Linfócitos (%)	59,33 $\pm$ 3,29	56,58 $\pm$ 4,05	62,30 $\pm$ 3,73	57,18 $\pm$ 5,48
Monócitos (%)	2,25 $\pm$ 0,37	3,75 $\pm$ 0,49	2,90 $\pm$ 0,53	3,45 $\pm$ 0,76
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	776,50 $\pm$ 20,61	768,42 $\pm$ 27,58	801,80 $\pm$ 32,08	812,82 $\pm$ 34,70

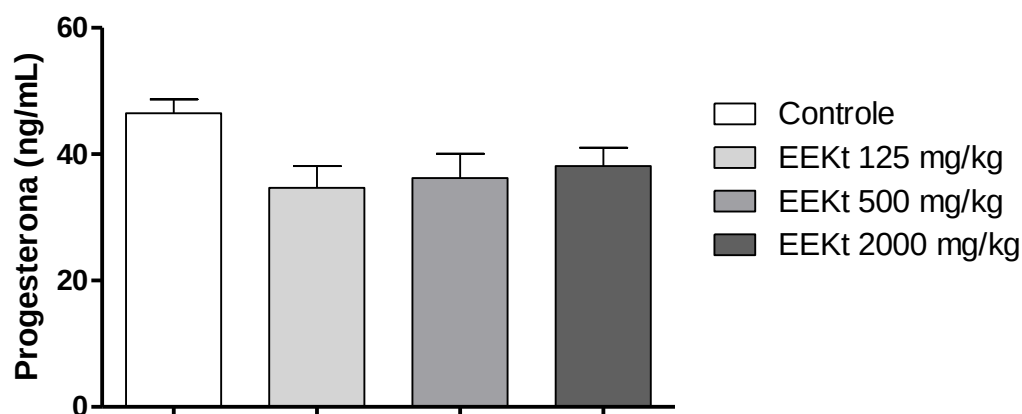
Valores expressos em média $\pm$ e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Figura 12 – Dosagem de testosterona no soro de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Figura 13 – Dosagem sérica de progesterona em ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

5.2.4 Análise macroscópica dos órgãos vitais e reprodutores

Não foi evidenciada qualquer anormalidade macroscópica de órgãos vitais e reprodutores de ratos tratados com as doses de 125, 500 e 2000 mg/kg do EEKt, considerando-se parâmetros tais como: aspecto, tamanho, cor e forma. Nenhuma redução significativa foi observada nos pesos absoluto e relativo dos rins, cérebro, pulmões, fígado e hipófise dos animais tratados com as três doses do extrato. Porém, houve um aumento significativo no peso relativo do coração dos animais tratados com as doses de 500 e 2000 mg/kg, quando comparado ao grupo controle. 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 31 e 32).

Na análise macroscópica de órgãos vitais e reprodutores das ratas tratadas durante o período de pré-implantação embrionária, pós-implantação e lactação com as três doses do EEKt, não observou-se qualquer alteração em relação ao aspecto, tamanho, cor e forma desses órgãos. Na pré-implantação, nenhuma redução significativa foi observada nos pesos absoluto dos órgãos vitais e reprodutores, entretanto a hipófise apresentou um aumento no seu peso absoluto nas ratas tratadas na dose de 2000 mg/kg. Nenhuma alteração foi evidenciada no peso relativo dos órgãos vitais e reprodutores das ratas tratadas nas doses de 125, 500 e 2000 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (Tabelas 33 e 34).

No período de pós-implantação e lactação, nenhuma alteração significativa foi observada no peso absoluto dos órgãos vitais e reprodutores das ratas tratadas com as doses de 125 mg/kg e 500 mg/kg do EEKt, porém observou-se uma diminuição no peso absoluto do fígado, nas ratas tratadas com a dose de 2000 mg/kg (Tabela 35). O peso relativo dos órgãos vitais e reprodutores das ratas tratadas com as diferentes doses do EEKt não diferiu, em relação ao grupo controle (Tabela 36).

Tabela 31 – Peso absoluto de órgãos vitais de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.

Peso absoluto (g)	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Rim direito	1,26 ± 0,07	1,13 ± 0,04	1,10 ± 0,04	1,10 ± 0,04
Rim esquerdo	1,21 ± 0,06	1,14 ± 0,03	1,14 ± 0,03	1,08 ± 0,03
Cérebro	1,22 ± 0,02	1,20 ± 0,04	1,24 ± 0,04	1,19 ± 0,03
Pulmões	1,69 ± 0,11	1,79 ± 0,10	2,26 ± 0,19	2,14 ± 0,34
Fígado	11,54 ± 0,54	10,76 ± 0,53	10,43 ± 0,48	10,00 ± 0,52
Coração	1,12 ± 0,05	1,06 ± 0,04	1,14 ± 0,04	1,09 ± 0,04
Hipófise (mg)	7,86 ± 0,82	7,08 ± 0,67	9,31 ± 1,29	6,94 ± 0,61
Epidídimo direito	0,54 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,50 ± 0,02
Próstata	0,40 ± 0,04	0,47 ± 0,06	0,33 ± 0,03	0,27 ± 0,02
Testículo direito	1,53 ± 0,05	1,45 ± 0,05	1,34 ± 0,10	1,56 ± 0,05
Testículo esquerdo	1,55 ± 0,04	1,45 ± 0,04	1,35 ± 0,12	1,57 ± 0,06
Vesícula seminal	1,25 ± 0,10	1,14 ± 0,08	0,98 ± 0,06	1,00 ± 0,09

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 32 – Peso relativo de órgãos vitais, reprodutores e glândulas sexuais acessórias de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.

Variáveis	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Peso corporal (g)	385,2±14,2	334,3±12,3	319,8±11,5	323,4±10,2
Peso relativo (%)				
Rim direito	0,33 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Rim esquerdo	0,33 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Cérebro	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,37 ± 0,01
Pulmões	0,44 ± 0,02	0,55 ± 0,05	0,73 ± 0,07	0,69 ± 0,15
Fígado	3,16 ± 0,11	3,23 ± 0,13	3,36 ± 0,12	3,07 ± 0,09
Coração	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,37 ± 0,01***	0,34 ± 0,01*
Hipófise	2,10 ± 0,22	2,10 ± 0,16	3,06 ± 0,39	2,01 ± 0,23
Epidídimo direito	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Próstata	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Testículo direito	0,41 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,04	0,49 ± 0,02
Testículo esquerdo	0,41 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,04	0,49 ± 0,02
Vesícula seminal	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,31 ± 0,03

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni, (n=12). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 33 – Peso absoluto de órgãos vitais e reprodutores de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.

Peso absoluto (g)	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Útero	0,63 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,61 ± 0,02
Ovário direito (mg)	33,17 ± 0,89	33,92 ± 1,29	32,63 ± 1,04	31,58 ± 0,73
Ovário esquerdo (mg)	33,50 ± 1,01	33,73 ± 1,46	31,17 ± 0,66	30,91 ± 0,59
Rim direito	0,80 ± 0,02	0,74 ± 0,03	0,80 ± 0,03	0,80 ± 0,02
Rim esquerdo	0,80 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,80 ± 0,03	0,77 ± 0,02
Fígado	6,75 ± 0,21	6,22 ± 0,32	7,31 ± 0,46	6,89 ± 0,21
Pulmões	1,24 ± 0,11	1,21 ± 0,12	1,60 ± 0,24	1,47 ± 0,11
Coração	0,76 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,82 ± 0,03
Cérebro	1,16 ± 0,03	1,17 ± 0,03	1,19 ± 0,03	1,20 ± 0,03
Hipófise (mg)	8,99 ± 0,15	8,99 ± 0,14	9,46 ± 0,15	10,06 ± 0,14***

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni, n=12. *** $p < 0,001$.

Tabela 34 – Peso relativo de órgãos vitais e reprodutores de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pré-implantação.

Variáveis	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Peso corporal (g)	251,5 ± 6,0	237,2 ± 6,7	242,2 ± 4,3	252,1 ± 5,7
Peso relativo (%)				
Útero	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Ovário direito	13,29 ± 0,52	14,32 ± 0,41	13,53 ± 0,51	12,57 ± 0,34
Ovário esquerdo	13,38 ± 0,44	14,34 ± 0,70	12,90 ± 0,29	12,30 ± 0,26
Rim direito	0,32 ± 0,06	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01
Rim esquerdo	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,00
Fígado	2,68 ± 0,05	2,63 ± 0,12	3,02 ± 0,19	2,74 ± 0,06
Pulmões	0,50 ± 0,04	0,50 ± 0,04	0,66 ± 0,09	0,59 ± 0,05
Coração	0,30 ± 0,09	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,01
Cérebro	0,46 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Hipófise	3,66 ± 0,11	3,83 ± 0,14	3,93 ± 0,11	4,01 ± 0,11

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 35 – Peso absoluto de órgãos vitais de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.

Órgãos	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Útero	0,62 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,58 ± 0,06	0,63 ± 0,01
Ovário direito (mg)	31,41 ± 0,55	32,62 ± 0,70	31,96 ± 0,91	31,56 ± 0,68
Ovário esquerdo (mg)	31,63 ± 1,06	32,81 ± 0,62	32,44 ± 0,10	31,34 ± 0,62
Rim direito	0,95 ± 0,02	0,89 ± 0,02	0,94 ± 0,05	0,87 ± 0,03
Rim esquerdo	0,93 ± 0,03	0,89 ± 0,03	0,90 ± 0,04	0,84 ± 0,04
Fígado	11,86 ± 0,49	10,47 ± 0,55	10,52 ± 0,68	9,84 ± 0,54*
Pulmões	1,34 ± 0,05	1,29 ± 0,05	1,53 ± 0,15	1,40 ± 0,09
Coração	0,90 ± 0,04	0,84 ± 0,04	0,84 ± 0,05	0,88 ± 0,05
Cérebro	1,90 ± 0,06	1,17 ± 0,06	1,16 ± 0,03	1,36 ± 0,06
Hipófise (mg)	9,85 ± 0,19	9,83 ± 0,24	9,87 ± 0,19	9,83 ± 0,29

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12). * $p < 0,05$.

Tabela 36 – Peso relativo de órgãos vitais e reprodutores de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.

Variáveis	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Peso corporal (g)	270,5 ± 7,52	241,6 ± 7,22	233,7 ± 11,32	252,9 ± 10,9
Peso relativo (%)				
Útero	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,01
Ovário direito	11,73 ± 0,45	13,39 ± 0,67	13,54 ± 0,72	12,54 ± 0,63
Ovário esquerdo	11,75 ± 0,36	13,39 ± 0,49	13,80 ± 0,86	12,53 ± 0,79
Rim direito	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Rim esquerdo	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,33 ± 0,02
Fígado	4,43 ± 0,23	4,27 ± 0,26	4,38 ± 0,24	3,87 ± 0,23
Pulmões	0,51 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,64 ± 0,06	0,55 ± 0,03
Coração	0,34 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,03
Cérebro	0,45 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,54 ± 0,03
Hipófise	3,67 ± 0,12	4,02 ± 0,18	4,19 ± 0,23	3,94 ± 0,27

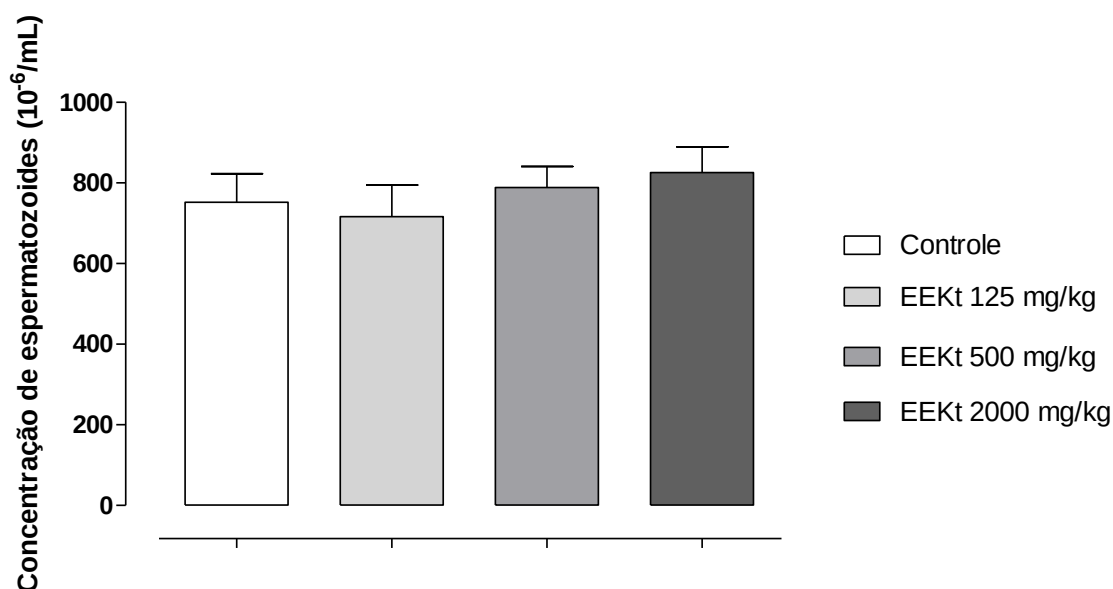
Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

5.2.5 Índices de fertilidade e de reprodução

5.2.5.1 Avaliação da capacidade reprodutiva de ratos Wistar expostos ao EEKt

Em ratos, a fertilidade foi avaliada pela concentração de espermatozoides (Figura 14) e proporção de espermatozoides normais e anormais (sem cauda, sem cabeça e com cauda curta ou enrolada) (Tabela 37) que não diferiram entre os animais dos grupos controle e tratados com o EEKt.

Figura 14 – Concentração de espermatozoides na secreção da cauda do epidídimo esquerdo de ratos nos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.



As colunas e barras verticais representam média $\pm$ e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

Tabela 37 – Proporção de espermatozoides normais e anormais de ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt por 52 dias.

Espermatozoides	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Normal	84,60 ± 0,97	83,11 ± 1,55	85,35 ± 0,53	80,70 ± 1,24
Somente cabeça	6,00 ± 0,65	6,50 ± 0,10	4,42 ± 0,25	7,86 ± 1,27
Somente cauda	8,27 ± 0,58	9,17 ± 0,85	8,71 ± 0,49	10,53 ± 0,55
Cauda curta	0,39 ± 0,11	0,33 ± 0,09	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,05
Cauda enrolada	0,81 ± 0,16	0,92 ± 0,22	1,31 ± 0,25	1,55 ± 0,28

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, (n=12).

5.2.5.1.2 Parâmetros avaliados nas fêmeas não tratadas e acasaladas com ratos tratados

a. Índices de fertilidade e de reprodução avaliados nas fêmeas que tiveram a gravidez interrompida no 15º dia de gestação

A administração do EEKt 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%). Não houve diferenças significativas nos índices de gestação, perdas pré-implantação e no índice de implantação das ratas acasaladas com ratos tratados com as doses de 125 mg/kg, 500 mg/kg e 2000 mg/kg do EEKt, quando comparados ao grupo controle. Não ocorreram alterações estatisticamente significativas do número de corpos lúteos, implantações e reabsorções (Tabela 38).

Tabela 38 – Variáveis reprodutivas em ratas (com gravidez interrompida no 15º dia), acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com EEKt durante 52 dias.

Variáveis	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Fêmeas acasaladas	12	12	12	12
Fêmeas inseminadas	12	12	12	12
Fêmeas com implantes	11	10	9	10
Índice de acasalamento ^(a)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)
Índice de gestação ^(a)	91,7% (11/12)	83,3% (10/12)	75,0% (9/12)	83,3% (10/12)
Corpos lúteos	11,12 ± 0,68	11,08 ± 0,34	11,00 ± 0,37	12,25 ± 0,69
Implantes	8,50 ± 1,13	8,25 ± 1,26	7,50 ± 1,35	8,42 ± 1,33
Reabsorções	0,17 ± 0,11	0,42 ± 0,15	0,50 ± 0,23	0,42 ± 0,19
Perdas pré-implantação ^(a)	23,9% (32/134)	25,6% (34/133)	31,8% (42/132)	31,3% (46/147)
Índice de implantação ^(a)	76,1% (102/134)	74,4% (99/133)	68,2% (90/132)	68,7% (101/147)

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, e em ^(a), pelos Testes do Qui-quadrado e teste exato de Fisher, (n=12).

Índice de acasalamento: [(fêmeas inseminadas/fêmeas acasaladas) x 100];

Índice de gestação: [(fêmeas com implantes/fêmeas inseminadas) x 100];

Índice de perdas pré-implantação: [(corpos lúteos - implantações/corpos lúteos) x 100];

Índice de implantação: [(implantações totais/corpos lúteos) x 100].

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

Nenhuma das doses investigadas do EEKt interferiu no número total de nascimentos e número de implantes. Porém, a razão sexual foi alterada de forma significativa, havendo uma maior proporção de machos nascidos em relação ao nascimento de fêmeas de ratas acasaladas com ratos tratados com as doses de 125 e 2000 mg/kg do EEKt. Os índices de nascimento e viabilidade não diferiram entre os grupos controle e tratados com o EEKt, porém houve uma diminuição de 7,1% e 6,1% no índice de desmame das ratas acasaladas com ratos expostos às doses de 500 mg/kg e 2000 mg/kg do EEKt, respectivamente (Tabelas 39 e 40).

Tabela 39 – Machos e fêmeas nascidos e desmamados de fêmeas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 52 dias.

Variáveis	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Machos nascidos	42	61	44	74
Fêmeas nascidas	69	58	55	39
Total de nascidos	111	119	99	113
Total de nascidos vivos	111	119	99	113
Razão sexual (machos/fêmeas)	42/69	61/58*	44/55	74/39***
Machos desmamados	42	59	42	70
Fêmeas desmamadas	68	56	49	35
Total de desmamados	110	115	91	105
Nº total de ninhadas	12	11	10	10
Nº total de ninhadas com perdas pós implantação	1	3	3	3

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado e pelo teste exato de Fisher. *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). (n=12).

Tabela 40 – Variáveis reprodutivas em ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com EEKt durante 52 dias.

Variáveis	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Índice de nascimento	100% (111/111)	100% (119/119)	100% (99/99)	97,7% (113/113)
Índice de viabilidade	100% (111/111)	100% (119/119)	100% (99/99)	100% (113/113)
Índice de desmame	99,1% (110/111)	96,6% (115/119)	92,0%* (91/99)	93,0%* (105/113)
Índice de perdas pós-implantação	8,3% (10/121)	9,8% (13/132)	15,4% (18/117)	14,4% (19/132)

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado e pelo teste exato de Fisher. *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). $n=12$ (nº de progenitoras).

Índice de nascimento: (nº de filhotes nascidos vivos / nº de filhotes nascidos) x 100.

Índice de viabilidade: (nº de filhotes vivos no 4º dia pós natal / nº de filhotes nascidos vivos) x 100.

Índice de desmame: (nº de filhotes vivos no desmame / nº de filhotes nascidos vivos) x 100.

Índice de perda pós-implantação: (nº de implantes – nº de filhotes vivos / nº de implantes) x 100.

5.2.5.2 Avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva de ratas Wistar expostas ao EEKt

5.2.5.2.1 Exposição durante o período de pré-implantação embrionária

O EEKt não influenciou no acasalamento das ratas tratadas, evidenciado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal de todas após o acasalamento (índice de acasalamento – 100%). Também não houve diferença significativa nos índices de gestação, em relação ao grupo controle. Verificou-se um aumento de 22,8% no índice de perdas pré-implantação e uma redução de 22,8% no índice de implantação das ratas que receberam a dose de 2000 mg/kg do EEKt, quando comparado ao grupo controle. O número de corpos lúteos, implantações e reabsorções não diferiram entre os grupos tratados e controle (Tabela 41).

Tabela 41 – Variáveis reprodutivas em ratas dos grupos controle e tratados com EEKt durante o período de pré-implantação.

Variáveis	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Fêmeas acasaladas	12	12	12	12
Fêmeas inseminadas	12	12	12	12
Fêmeas com implantes	11	09	9	08
Índice de acasalamento ^(a)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)
Índice de gestação ^{a)}	91,7% (11/12)	75,0% (09/12)	75,0% (9/12)	66,7% (08/12)
Corpos lúteos	9,42 ± 0,97	8,00 ± 1,18	8,75 ± 1,19	8,92 ± 1,19
Implantes	7,25 ± 1,41	5,83 ± 1,38	5,75 ± 1,48	4,83 ± 1,45
Reabsorções	0,08 ± 0,08	0,42 ± 0,34	0,58 ± 0,34	0,75 ± 0,33
Perdas pré-implantação ^(a)	23,0% (26/113)	27,1% (26/96)	34,3% (36/105)	45,8%*** (49/107)
Índice de implantação ^(a)	77,0% (87/113)	72,9% (70/96)	65,7% (69/105)	54,2%*** (58/107)

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, e em ^(a), pelos Testes do Qui-quadrado e teste exato de Fisher, (n=12). *** $p < 0,001$.

Índice de acasalamento: [(fêmeas inseminadas/fêmeas acasaladas) x 100];

Índice de gestação: [(fêmeas com implantes/fêmeas inseminadas) x 100];

Índice de perdas pré-implantação: [(corpos lúteos - implantações/corpos lúteos) x 100];

Índice de implantação: [(implantações totais/corpos lúteos) x 100].

5.2.5.2.2 Exposição durante o período gestacional (pós-implantação) e lactação

Os índices de acasalamento, gestação, nascimento e viabilidade das ratas tratadas com o EEKt não sofreram alteração significativa nas três doses administradas (125, 500 e 2000 mg/kg), quando comparados ao grupo controle. Foi registrado um aumento significativo de 10,8% e de 13,2% nos índices de perdas pós-implantação das ratas que receberam o EEKt nas doses de 500 e 2000 mg/kg, respectivamente. O EEKt também influenciou nos resultados do índice de desmame, evidenciado por uma diminuição de 11,6% na dose de 500 mg/kg e de 11,5% na dose de 2000 mg/kg (Tabela 42).

Tabela 42 – Variáveis reprodutivas em ratas dos grupos controle e tratados com EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.

Variáveis	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Fêmeas acasaladas	12	12	12	12
Fêmeas inseminadas	12	12	12	12
Fêmeas com implantes	12	12	10	11
Implantes	11,08 ± 0,80	10,25 ± 0,55	11,20 ± 2,12	13,00 ± 1,37
Reabsorções	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Índice de acasalamento ^(a)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)
Índice de gestação ^(a)	100,0% (12/12)	100,0% (12/12)	83,3% (10/12)	91,7% (11/12)
Índice de nascimento ^(a)	100% (132/132)	100% (113/113)	100% (99/99)	99,2% (123/124)
Índice de viabilidade ^(a)	100% (132/132)	100% (113/1113)	100% (99/99)	100% (123/123)
Índice de desmame ^(a)	98,5% (130/132)	94,7% (107/113)	86,9%*** (86/99)	87,0%*** (107/123)
Índice de perdas pós-implantação ^(a)	0,8% (1/133)	4,2% (5/118)	11,6%*** (13/112)	14,0%*** (20/143)

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni, e em ^(a), pelos Testes do Qui-quadrado e teste exato de Fisher, (n=12). *** p<0,001.

Índice de acasalamento: [(fêmeas inseminadas/fêmeas acasaladas) x 100];

Índice de gestação: [(fêmeas com implantes/fêmeas inseminadas) x 100];

Índice de nascimento: (nº de filhotes nascidos vivos / nº de filhotes nascidos) x 100.

Índice de viabilidade: (nº de filhotes vivos no 4º dia pós natal / nº de filhotes nascidos vivos) x 100.

Índice de desmame: (nº de filhotes vivos no desmame / nº de filhotes nascidos vivos) x 100.

Índice de perda pós-implantação: (nº de implantes – nº de filhotes vivos / nº de implantes) x 100.

A proporção de descendentes machos e fêmeas não foi alterada, resultado confirmado pela razão sexual, que se apresentou normal nas ratas tratadas com as diferentes doses do EEKt (Tabela 43).

Tabela 43 – Machos e fêmeas nascidos e desmamados de ratas dos grupos controle e tratados com EEKt durante o período de pós-implantação e lactação.

Variáveis	EEKt			
	Controle	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
Machos nascidos	67	58	56	68
Fêmeas nascidas	65	55	43	56
Total de nascidos	132	113	99	124
Total de nascidos vivos	132	113	99	123
Razão sexual (machos/fêmeas)	67/65	58/55	56/43	68/56
Machos desmamados	66	56	50	59
Fêmeas desmamadas	64	51	36	48
Total de desmamados	130	107	86	107
Nº total de ninhadas	12	12	10	11
Nº total de ninhadas com perdas pós-implantação	2	3	2	3

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado e pelo teste exato de Fisher. *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). n=12 (nº de progenitoras).

5.3 Parâmetros avaliados na progênie

a. Desenvolvimento geral

A administração do EEKt (125, 500 e 2000 mg/kg) a ratos não causou alteração significativa no peso corporal de seus descendentes (Tabelas 44 e 45). Da mesma forma, o peso da prole proveniente das ratas tratadas com o EEKt não diferiu do grupo controle (Tabelas 46 e 47).

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 EEKt e os que receberam apenas veículo (Tabela 48). Esses parâmetros também apresentaram-se normais na prole das ratas tratadas com as diferentes doses do EEKt, quando comparados ao grupo controle (Tabela 49).

Não foi evidenciada a presença de anormalidades externas ou qualquer sinal de malformação na prole proveniente de progenitoras acasaladas com ratos expostos às diferentes doses do EEKt e de progenitoras tratadas com o EEKt.

Tabela 44 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole masculina de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	6,12 ± 0,52	7,22 ± 0,53	8,01 ± 0,44	6,46 ± 0,18
7	16,31 ± 0,96	17,27 ± 1,04	20,96 ± 1,81	20,29 ± 0,41
14	29,37 ± 1,91	27,71 ± 1,69	32,22 ± 3,07	33,93 ± 1,61
21	39,56 ± 2,75	37,97 ± 2,38	43,70 ± 4,29	48,03 ± 1,83

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni (n=12).

Tabela 45 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole feminina de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	7,90 ± 1,15	6,55 ± 0,24	5,93 ± 0,33	8,18 ± 1,06
7	19,44 ± 3,94	16,04 ± 0,78	16,45 ± 1,26	19,47 ± 2,06
14	25,21 ± 1,33	25,94 ± 1,54	24,22 ± 1,52	29,74 ± 3,28
21	33,81 ± 2,13	35,39 ± 2,33	32,83 ± 2,04	40,25 ± 4,63

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni (n=12).

Tabela 46 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole masculina de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	7,09 ± 0,30	6,32 ± 0,30	7,17 ± 0,50	6,53 ± 0,34
7	14,62 ± 0,70	13,31 ± 0,86	14,65 ± 0,73	13,26 ± 0,49
14	26,18 ± 1,39	22,82 ± 1,45	25,50 ± 1,40	22,65 ± 1,02
21	36,89 ± 2,44	31,72 ± 2,31	37,67 ± 2,64	33,19 ± 1,77

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni (n = 12).

Tabela 47 – Média dos valores de peso corporal (g) da prole feminina de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt durante 21 dias.

Dia	Controle	EEKt		
		125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg
1	6,97 ± 0,29	6,24 ± 0,48	7,11 ± 0,38	6,64 ± 0,43
7	13,67 ± 0,77	14,09 ± 1,09	14,75 ± 0,77	14,46 ± 1,01
14	24,46 ± 1,39	23,55 ± 1,22	25,10 ± 1,36	25,05 ± 2,78
21	34,15 ± 2,59	32,76 ± 2,27	37,06 ± 2,80	34,21 ± 3,27

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni (n=12).

Tabela 48 – Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos descendentes machos e fêmeas de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt.

Variáveis	EEKt			
	Controle n=42 machos 69 fêmeas	125 mg/kg n=61 machos 58 fêmeas	500 mg/kg n=44 machos 55 fêmeas	2000 mg/kg n=74 machos 39 fêmeas
Lanugo	7,58 ± 0,40	7,55 ± 0,28	7,40 ± 0,54	7,00 ± 0,45
Pelos	11,33 ± 0,43	11,09 ± 0,31	10,90 ± 0,50	10,90 ± 0,43
Erupção dos incisivos (início)	10,33 ± 0,31	10,82 ± 0,23	10,70 ± 0,30	10,60 ± 0,31
Abertura palpebral ocular	15,25 ± 0,49	16,00 ± 0,38	15,30 ± 0,45	15,50 ± 0,82
Deslocamento do pavilhão auricular	4,67 ± 0,57	5,36 ± 0,43	5,00 ± 0,42	4,40 ± 0,43
Abertura do pavilhão auricular	17,25 ± 0,33	16,75 ± 0,43	16,20 ± 0,42	17,00 ± 0,45
Abertura canal vaginal	35,42 ± 0,31	34,73 ± 0,54	34,20 ± 0,98	33,80 ± 0,80
Descida dos testículos	16,92 ± 0,51	17,64 ± 0,34	18,20 ± 0,63	17,40 ± 0,67

Valores expressos em media ± e.p.m., respectivamente. (n=número de filhotes). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni.

Tabela 49 – Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos descendentes machos e fêmeas de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt.

Variáveis	EEKt			
	Controle n=67 machos 65 fêmeas	125 mg/kg n=58 machos 55 fêmeas	500 mg/kg n=56 machos 43 fêmeas	2000 mg/kg n= 68 machos 55 fêmeas
Lanugo	6,92 ± 0,26	6,92 ± 0,34	7,50 ± 0,37	7,36 ± 0,20
Pelos	12,50 ± 0,19	12,00 ± 0,28	12,30 ± 0,34	11,73 ± 0,20
Erupção dos incisivos (início)	10,17 ± 0,27	10,50 ± 0,29	10,70 ± 0,37	10,45 ± 0,28
Abertura palpebral ocular	15,00 ± 0,35	15,33 ± 0,43	15,30 ± 0,40	15,55 ± 0,51
Deslocamento do pavilhão auricular	3,67 ± 0,31	3,33 ± 0,19	3,30 ± 0,37	4,09 ± 0,55
Abertura do pavilhão auricular	17,25 ± 0,33	16,75 ± 0,43	16,20 ± 0,42	17,00 ± 0,45
Abertura canal vaginal	35,42 ± 0,29	35,50 ± 0,60	36,30 ± 0,78	36,00 ± 0,47
Descida dos testículos	15,92 ± 9,31	16,92 ± 0,47	16,50 ± 0,65	17,64 ± 0,43

Valores expressos em media ± e.p.m., respectivamente. (n=número de filhotes). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni.

b. Análise comportamental

As tabelas 50 e 51 mostram 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) na prole de ratas acasaladas com ratos tratados e prole proveniente de fêmeas tratadas, respectivamente, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 50 – Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto na prole de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt.

Variáveis	EEKt			
	Controle n=110	125 mg/kg n=115	500 mg/kg n=91	2000 mg/kg n=105
Ambulação (frequência)	35,00 ± 1,41	36,07 ± 1,45	38,88 ± 1,50	36,15 ± 1,95
Auto limpeza (segundos)	3,62 ± 0,36	3,39 ± 0,65	5,93 ± 0,93	4,32 ± 1,00
Bolos fecais (frequência)	4,46 ± 0,36	4,66 ± 0,23	4,81 ± 0,25	5,23 ± 0,25
Levantadas (frequência)	20,88 ± 1,48	20,93 ± 1,22	23,59 ± 0,93	20,05 ± 1,08

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni.

Tabela 51 – Parâmetros observados durante avaliação comportamental de campo aberto na prole de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt.

Variáveis	EEKt			
	Controle n=130	125 mg/kg n=107	500 mg/kg n=86	2000 mg/kg n=107
Ambulação (frequência)	38,12 ± 1,40	33,3 ± 2,10	34,70 ± 1,90	32,3 ± 2,80
Auto limpeza (segundos)	3,62 ± 0,60	3,62 ± 0,60	5,93 ± 0,90	4,32 ± 1,00
Bolos fecais (frequência)	4,60 ± 0,40	4,39 ± 0,27	3,78 ± 0,43	3,93 ± 0,54
Levantadas (frequência)	16,75 ± 0,70	13,18 ± 1,05	15,01 ± 1,30	13,01 ± 1,30

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni.

c. Desenvolvimento reflexológico

Na prole de ratas acasaladas com ratos controle e tratados com as diferentes doses do EEKt, não foram observadas alterações significativas no reflexo de endireitamento, entretanto houve atraso no aparecimento dos reflexos de andar adulto e geotaxia negativa nos descendentes de ratas que receberam a dose de 2000 mg/kg do EEKt (Tabela 52). Os descendentes de ratas tratadas com o EEKt apresentaram os reflexos de endireitamento e andar adulto normais, porém ocorreu um atraso significativo no reflexo de geotaxia negativa na dose de 2000 mg/kg do extrato, quando comparado ao grupo controle (Tabela 53).

Tabela 52 – Desenvolvimento reflexológico dos descendentes de ratas acasaladas com ratos dos grupos controle e tratados com o EEKt.

	Controle n=111	EEKt		
		125 mg/kg n=119	500 mg/kg n=99	2000 mg/kg n=113
Endireitamento	2,67 ± 0,22	2,64 ± 0,15	2,80 ± 0,20	3,40 ± 0,16
Andar adulto	7,92 ± 0,26	8,00 ± 0,33	8,60 ± 0,27	9,70 ± 0,30***
Geotaxia negativa	7,42 ± 0,31	7,82 ± 0,23	8,40 ± 0,31	9,20 ± 0,36***

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente (n = 12). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

Tabela 53 – Desenvolvimento reflexológico da prole de ratas dos grupos controle e tratados com o EEKt.

Variáveis	Controle n=132	EEKt		
		125 mg/kg n=113	500 mg/kg n=99	2000 mg/kg n=123
Endireitamento	2,17 ± 0,24	2,92 ± 0,26	2,10 ± 0,10	3,27 ± 0,57
Andar adulto	8,17 ± 0,27	8,25 ± 0,25	8,50 ± 0,34	9,27 ± 0,41
Geotaxia negativa	7,58 ± 0,26	8,00 ± 0,25	7,90 ± 0,31	9,08 ± 0,36**

Valores expressos em média ± e.p.m., respectivamente (n = 12). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

Discussão

6 DISCUSSÃO

K. tomentosa é uma espécie de planta bastante utilizada na medicina popular, por suas propriedades adstringentes. Contudo, são escassos os estudos sobre sua atividade toxicológica, e estudos de toxicidade reprodutiva para essa planta são inexistentes. Metabólitos secundários, como lignanas e neolignanas, foram identificados na constituição química de *K. tomentosa*. Embora esses constituintes apresentem grande importância terapêutica, devido às suas propriedades farmacológicas, inclusive estrogênica e antiestrogênica, também possuem ação adversa no organismo, incluindo o sistema reprodutor (SIMPSON, 1991; SILVA, 2001; ADLERCREUTZ et al., 2002; DE SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012).

Nesse estudo, investigou-se a toxicidade do extrato etanólico de *K. tomentosa* sobre o sistema reprodutor masculino e feminino, órgãos vitais e proles de ratos e ratas Wistar adultos. Anteriormente aos ensaios de toxicidade reprodutiva, avaliou-se a toxicidade oral aguda em dose única do EEKt e da FHEEKt.

Os ensaios de avaliação de toxicidade aguda são bastante utilizados como critério para classificar uma determinada substância quanto ao seu potencial nocivo, contribuindo, portanto, no estabelecimento de parâmetros de segurança para o seu uso (CUNHA et al., 2013).

A partir dos protocolos empregados, foi demonstrado que tanto o EEKt quanto a FHEEKt possuem baixa toxicidade oral aguda, o que foi evidenciado pela ausência de mortalidade ou morbidade, durante os 14 dias de avaliação, nas ratas que receberam as doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg do extrato ou da fração, em dose única. Esses resultados não corroboram o achado de Vieira e colaboradores (1968), que demonstraram que em camundongos tratados pela via intraperitoneal, a administração do extrato alcoólico de *K. tomentosa* causou a morte de animais em experimentação. Entretanto, além das espécies animais utilizadas nesses estudos serem diferentes, deve-se considerar também as diferenças farmacocinéticas existentes nas vias de administração utilizadas, o que pode justificar as distintas respostas dos animais frente ao tratamento com *K. tomentosa* (CUNHA et al., 2009).

O *screening* hipocrático é um estudo de triagem de grande utilidade, empregado na avaliação das atividades farmacológicas e toxicológicas de plantas (LUCIO et al., 2000; CUNHA et al., 2013). O EEKt e a FHEEKt não interferiram na maioria dos parâmetros avaliados nesse ensaio, pois, com exceção de uma discreta redução, após a primeira hora de observação, na resposta ao pinçamento da cauda dos animais tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, as atividades geral e de coordenação do sistema motor e muscular apresentaram-se normais e os parâmetros relacionados às atividades do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA) também não foram alterados, indicando que o EEKt e a FHEEKt parecem não influenciar a atividade motora e o estado geral e de consciência dos animais. Estudos de toxicidade oral aguda, descritos na literatura já mostraram a relação de plantas medicinais de uso popular associada a alterações sobre esses parâmetros, demonstrando, por exemplo, atividade sedativa ou estimulante de plantas sobre o SNC (KANJANAPOTHI et al., 2004). No presente trabalho, embora tenha sido detectada moderada redução dos reflexos auricular e corneal nos animais tratados nas primeiras horas de observação, posteriormente essas alterações foram normalizadas, sugerindo que o tratamento com o EEKt ou FHEEKt não exerceu alteração com relevância clínica sobre a atividade reflexa de ratas (CUNHA et al., 2009).

O teste do campo aberto é utilizado na avaliação da capacidade exploratória e do grau de emocionalidade de animais de laboratório, tendo a ambulação e o comportamento de levantar como atividades que refletem, principalmente, uma boa coordenação motora, enquanto o comportamento de limpeza e a defecação estão mais associados ao estado emocional do animal. Resultados que demonstram acréscimo no tempo de permanência dos animais na parte central do campo aberto são indicativos de ansiedade; locomoção aumentada sugere efeito estimulante; e o decréscimo da locomoção e da frequência com que o animal permanece sobre as patas traseiras, indica sedação (CARLINI, 1979; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2004; SACHETTI et al., 2009). Os resultados obtidos nesse estudo, após a avaliação do teste do campo aberto, mostraram que, nas ratas tratadas com o EEKt ou FHEEKt, não houve alterações nos parâmetros comportamentais avaliados, sugerindo a ausência de efeitos depressor ou estimulante sobre o SNC nesses animais (NETO et al., 2012).

A avaliação do peso corporal durante o tratamento com uma determinada substância fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais em experimentação. Um decréscimo no ganho de massa pode evidenciar uma variedade de respostas, incluindo anorexia induzida pelo tratamento, ou toxicidade sistêmica (US EPA, 1996; SÁ et al., 2000; MULLER, 2007; SANTOS, 2012). Apesar de ter havido diminuição do consumo de água e de ração nos animais que receberam o EEKt e a FHEEKt nas doses de 300 mg/kg e de 2000 mg/kg, esse resultado não influenciou na evolução ponderal, que manteve-se normal, quando comparado aos grupos controle, corroborando a baixa toxicidade do EEKt e da FHEEKt nas condições estudadas.

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 alteração nesse parâmetro pode ocorrer sem, necessariamente, estar relacionada com alterações da massa corporal (US EPA, 1996; BÚFALO, 2007). Apesar do aumento observado no peso absoluto de pulmões e fígado após o tratamento agudo com o EEKt ou FHEEKt, o peso relativo desses órgãos apresentou-se normal e nenhuma alteração macroscópica foi encontrada nesses órgãos. Embora também tenha se observado um ganho de peso relativo dos rins após tratamento com a FHEEKt, a avaliação macroscópica desse órgão mostrou-se inalterada, sendo assim, necessária a realização de ensaios histopatológicos para confirmar um possível dano causado pelo extrato e fração sobre os órgãos analisados.

A partir desses resultados, foi observado que a toxicidade oral aguda do EEKt e da FHEEKt foi maior que 2000 mg/kg *pc* e classificada como “categoria 5”, de acordo com os critérios do protocolo experimental utilizado, isto é, classe de substâncias de muito baixa toxicidade, sem ocorrência de letalidade nas doses utilizadas (OECD, 2001).

O potencial tóxico do extrato etanólico de *K. tomentosa* sobre o sistema reprodutor de ratos, durante o período correspondente a um ciclo espermato gênico e de ratas, nas fases de pré-implantação, organênese e período lactacional foi estudado posteriormente, seguindo protocolos experimentais específicos relevantes à avaliação da toxicidade dessa espécie vegetal, utilizando-se a avaliação de parâmetros, tais como sinais clínicos gerais de toxicidade, evolução ponderal, consumo diário de água e ração,

análises bioquímicas, hematológicas e hormonal, peso de órgãos vitais e reprodutores, além da avaliação de índices reprodutivos. Durante esses ensaios, é fundamental avaliar a possível influência da substância em estudo sobre o organismo das progenitoras, visto que a toxicidade materna pode se manifestar como uma alteração transitória ou permanente na fisiologia da mãe, podendo refletir-se na prole, através do aparecimento de efeitos adversos durante o desenvolvimento embrionário ou pós-natal, além da ocorrência de malformações (BORGES et al., 2005; MOTTA, 2014) .

No presente trabalho, não foram evidenciados sinais clínicos de toxicidade, como comprometimento do sistema locomotor e piloereção, e nem morte dos ratos expostos às diferentes doses do extrato, bem como de ratas expostas durante o período de pré-implantação embrionária. Contudo, durante o período de pós-implantação e lactação foram observados episódios diarreicos e de piloereção e três mortes maternas no grupo tratado com a dose de 500 mg/kg do extrato, e duas mortes maternas no grupo tratado com a dose de 2000 mg/kg. Esses resultados, portanto, sinalizam indícios de toxicidade materna induzida pelo EEKt, no período de exposição abordado.

A ação tóxica de uma determinada substância é comumente avaliada, entre outros parâmetros, através do monitoramento da massa corporal e do consumo de água e ração, visto que um decréscimo nos valores desses parâmetros durante a administração de determinada substância, além de indicar a ocorrência de efeito tóxico sobre o organismo, também fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais no período experimental estudado. Além disso, alterações do ganho de massa são importantes para a análise de efeitos reprodutivos, pois pode ser indicativo de toxicidade sistêmica (SÁ, 2003; MULLER, 2007, EPA, 1996). É bem descrito na literatura a relação da utilização de plantas medicinais de uso popular em ratas grávidas com a ocorrência de toxicidade materna, evidenciada por alterações nesses parâmetros (DE ALMEIDA et al., 2009; SILVA, 2014).

A exposição oral, por 52 dias, ao EEKt não influenciou no consumo de água e ração de ratos, que manteve-se normal nos grupos tratados. Entretanto, observou-se redução da massa corporal desses animais, sugerindo a ocorrência de efeitos tóxicos causados pelo EEKt.

Os indícios de toxicidade nas progenitoras estão relacionados à redução da massa corporal, acompanhada ou não da queda de consumo de alimentos. Entretanto, o peso corporal oscila normalmente com o estado fisiológico do animal, pois está relacionado às variações dos hormônios sexuais (estrogênio e progesterona), que influenciam na ingestão de alimentos, retenção de líquidos, deposição de gorduras e no consumo energético (MULLER, 2007; ROMAN et al., 2014). Apesar do tratamento com o EEKt, nas doses de 125, 500 e 2000 mg/kg, durante o período de pré-implantação, ter causado redução do consumo de água e ração, talvez devido às mudanças fisiológicas ocorridas no período gestacional, não foi observada alteração do peso corporal das progenitoras tratadas. Além disso, como já mencionado, também não foram detectados sinais gerais de toxicidade ou óbito.

No período de pós-implantação, embora o consumo diário de água e ração não tenha diferido entre os grupos tratados e controle, foi registrada uma redução do peso de ratas tratadas ao longo do período lactacional, sugerindo um possível efeito tóxico do EEKt. Entretanto, deve-se considerar que durante esse período é normal que haja um aumento de queima calórica nas lactentes (OLIVEIRA et al., 2016)

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue são importantes indicadores de saúde e fornecem informações úteis acerca do funcionamento normal do organismo. São frequentemente utilizados no diagnóstico e compreensão do impacto toxicológico causado por determinadas substâncias tóxicas, sendo também utilizados na avaliação da toxicidade reprodutiva (AUTHMAN et al., 2013; HARABAWY; IBRAHIM, 2014; BOLL et al., 2014).

Os níveis séricos das transaminases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), por exemplo, são utilizados na investigação e monitoramento de doenças hepáticas, incluindo a hepatite tóxica e processos tóxico-químicos (PINTO et al., 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; TEIXEIRA et al., 2009; ASHAFA; OREKOYA; YAKUBU, 2012). A avaliação da função hepática é um dado importante nos estudos de toxicidade reprodutiva, uma vez que a ocorrência de alterações hepáticas pode prejudicar o processo reprodutivo, através de modificações nos níveis circulantes dos hormônios sexuais (FERREIRA; MEDEIROS, 2000). Neste experimento, os níveis séricos das enzimas ALT e AST de ratos tratados não foram

modificados, além de não ter sido registrada alteração macroscópica ou no peso do fígado desses animais, indicando que o tratamento com o EEKt não induziu hepatotoxicidade em ratos tratados.

Os parâmetros bioquímicos também são importantes na avaliação da função renal, onde os níveis séricos de ureia, ácido úrico e creatinina são fatores relevantes no diagnóstico de danos renais (AL-HABORI et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2009). Esses parâmetros não foram alterados nos ratos tratados com o EEKt, sugerindo ausência de dano renal relacionado ao uso do extrato.

O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico mais frequentemente utilizados, que permite a quantificação dos elementos celulares do sangue. É constituído pelo eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas (SWENSON, 1988; JAIN, 1993; DESCAT, 2002; FAILACE, 2003; ASHAFA; OREKOYA; YAKUBU, 2012). Alterações nos parâmetros hematológicos podem indicar toxicidade hematológica derivada do tratamento com uma determinada substância, que pode ser evidenciada principalmente pela redução do número de plaquetas (trombocitopenia), de neutrófilos (neutropenia) e de hemácias (anemia) (MESSIAS et al., 2009). O EEKt parece não exercer efeito tóxico no sangue dos ratos tratados, considerando que nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos foi evidenciada pelo tratamento.

A avaliação do perfil bioquímico e hematológico das ratas tratadas com o EEKt no período de pré-implantação embrionária não diferiu do grupo controle, sugerindo que a administração do extrato não refletiu em alterações na capacidade metabólica e no funcionamento normal de órgãos específicos, como o fígado e os rins, visto que os parâmetros hepáticos (AST e ALT) e renais (uréia, ácido úrico e creatinina) apresentaram-se normais, indicando ausência de danos hepatocelulares e nefrotóxicos do EEKt nessa fase.

Durante o período de pós-implantação e lactação, a administração do EEKt não modificou o perfil hematológico das progenitoras, enquanto na avaliação dos parâmetros bioquímicos, evidenciou-se que nas doses de 500 mg/kg e 2000 mg/kg do extrato houve uma redução dos níveis séricos de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade). Entretanto, é normal na gravidez e no período pós-parto a ocorrência de

alterações no metabolismo das lipoproteínas maternas que visam satisfazer as exigências nutricionais do feto (WINCLER et al., 2000). Portanto, alteração nos níveis séricos de LDL durante esse período pode estar associado à regulação das atividades de lipases maternas por hormônios placentários, tendo, como consequência, alterações metabólicas, que podem resultar num maior fluxo de lípidos derivados de lipoproteínas para a placenta, acompanhada, à medida que a gestação progride, da expressão acentuada de receptores com grande afinidade por lipoproteínas de baixa densidade. Dessa forma, a diminuição observada nos níveis séricos de LDL parece não estar associada aos efeitos do EEKt, mas às condições fisiológicas maternas, considerando-se que nos períodos gestacional e lactacional, uma variação nesse parâmetro já é esperada (KNOPP, 1985; WINCLER et al., 2000; BRITO et al., 2006).

Em ensaios pré-clínicos de toxicidade reprodutiva, a avaliação do funcionamento de órgãos vitais é de grande relevância, ao se levar em consideração que possíveis alterações nesses órgãos podem prejudicar o processo reprodutivo (SÁ, 2003; SILVA, 2010). A avaliação do peso desses órgãos é importante, tendo como exemplo o fígado e os rins, que estão diretamente envolvidos nos processos metabólicos e na eliminação de substâncias, respectivamente, porém sujeitos à variações em suas massas em casos de intoxicação paterna ou materna (MELLO, 2007; DE SOUSA FERREIRA et al., 2014).

Em ratos, dentre os órgãos avaliados, foi possível observar que apenas em relação ao coração foi observado um aumento no peso relativo após tratamento com o EEKt, sugerindo um possível efeito tóxico sobre esse órgão, porém a realização de estudos histopatológicos e a avaliação de biomarcadores cardíacos seriam necessários para caracterizar uma possível cardiotoxicidade induzida pela administração do EEKt em ratos (SWAMY et al., 2013). Os resultados obtidos indicam que o tratamento com o EEKt não teve efeito tóxico específico sobre a maioria dos órgãos vitais de ratos, contudo tais resultados não eliminam a possibilidade do mesmo 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 (SANTOS, 2012). Por exemplo, Marques e colaboradores (2016) demonstraram que a suspensão do extrato aquoso de *Valeriana officinalis* L., planta

medicinal também comumente utilizada na medicina popular, não alterou o peso corporal, nem o peso dos órgãos vitais e reprodutores avaliados em ratos, porém, interferiu com o sistema reprodutor masculino, causando aumento do número de gametas anormais e aumento da altura do epitélio epididimal nesses animais.

A exposição materna ao EEKt, durante o período de pré-implantação, não alterou as massas absolutas e relativas dos órgãos vitais (rins, fígado, pulmões, coração e cérebro) e nem a estrutura macroscópica. Esse resultado corrobora os dados discutidos anteriormente, os quais fazem referência à inexistência de efeito tóxico direto do EEKt sobre esses órgãos, bem como ausência de toxicidade sistêmica materna. Entretanto, deve-se considerar o curto período de exposição dos animais ao extrato e a necessidade da realização de estudos mais específicos, como ensaios histopatológicos, para confirmar esses resultados.

No período de pós-implantação e lactação observou-se uma diminuição no peso absoluto do fígado (2000 mg/kg), sugerindo um possível efeito tóxico específico do EEKt sobre esse órgão, nas condições avaliadas. Alterações hepáticas resultam em modificações nos níveis circulantes dos hormônios sexuais, que podem causar aumento dos níveis de estrogênios, supressão das gonadotrofinas e diminuição dos níveis de testosterona (FERREIRA; MEDEIROS, 2000). No entanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizar um possível efeito hepatotóxico induzido pelo EEKt, já que o peso relativo do fígado não foi diferente entre os grupos tratados e controle e nenhuma alteração macroscópica ter sido verificada nesse órgão, além dos parâmetros bioquímicos hepáticos que apresentaram-se normais nos grupos experimentais. Os demais órgãos vitais investigados não evidenciaram ganho ou perda de peso significativo ou anormalidade macroscópica, sugerindo ausência de dano direto nesses órgãos, provocado pelo tratamento com o EEKt, no período experimental avaliado.

Em ensaios pré-clínicos de toxicidade reprodutiva, além do registro dos pesos corporal e de órgãos vitais, é também realizada a avaliação do peso de órgãos reprodutores e das glândulas sexuais acessórias, pois a presença de alterações no peso absoluto ou relativo desses órgãos pode fornecer evidências capazes de classificar um agente como potencialmente tóxico ao sistema reprodutor (ZENICK;

CLEGG, 1989; CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001, SANTOS et al., 2016). A avaliação desse parâmetro é essencial para a interpretação da toxicidade reprodutiva, como é o caso da massa absoluta dos ovários, que é dependente do número e do volume dos corpos lúteos. Estas estruturas são as maiores encontradas na gônada feminina e fornecem, de forma indireta, informações sobre as condições hormonais das progenitoras, uma vez que o aumento de seu tamanho está correlacionado ao aumento da secreção de progesterona, hormônio essencial para o sucesso da gestação (KATO et al., 1979; EPA, 1996; VANZELER et al., 2015).

Determinadas substâncias são capazes de atravessar a barreira testicular, e interferir na espermatogênese, assim, o peso do testículo aparece como um parâmetro confiável na avaliação de lesão gonadal, por apresentar pouca variabilidade dentro de uma mesma espécie (BLAZAK et al., 1985; FOOTE et al., 1986; CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001, LENT et al., 2015; SAENPHET; JITJAINGAN; CHAIYAPO, 2015). A próstata e a vesícula seminal também são órgãos andrógeno-dependentes, e seus pesos podem refletir mudanças no estado endócrino ou função testicular do animal (EPA, 1996).

Nenhuma mudança significativa nos pesos dos testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal foi observada após a exposição dos ratos ao EEKt. A ausência de alteração do peso indica que o extrato não interferiu na integridade funcional dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias avaliados, fato corroborado pela ausência de alterações macroscópicas nessas estruturas. De forma semelhante, estudos realizados por Santos e colaboradores (2016) demonstraram que a administração a ratos do extrato de *Pradosia huberi* Ducke, planta medicinal de uso popular, não causou alteração estrutural ou funcional dos órgãos reprodutores e glândulas sexuais acessórias desses animais, avaliado pela ausência de diminuição do peso dos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias.

A exposição materna ao EEKt, durante os períodos de pré-implantação, pós-implantação e lactação não alterou as massas absoluta e relativa dos órgãos reprodutivos (útero e ovários), e nem causou alterações macroscópicas nesses órgãos. Estes resultados indicam ausência de toxicidade direta sobre os órgãos reprodutores das progenitoras, nas concentrações investigadas. Entretanto, durante a investigação

do potencial tóxico de uma substância sobre o sistema reprodutor feminino, devem-se considerar outros aspectos importantes, como a regulação hormonal da reprodução feminina, já que a ação tóxica de um composto pode não estar relacionada apenas com sua interferência direta sobre os órgãos reprodutivos, mas pode também resultar de sua ação sobre a hipófise, vindo a comprometer o funcionamento das gônadas (EPA, 1996; ROCHA et al., 2012).

O eixo hipotalâmico-hipofisário-testículos (HHT) regula a secreção do FSH/LH, que atuam diretamente nos testículos e influenciam o comportamento funcional das glândulas sexuais acessórias. (SOKOL, 1997; FRAIETTA; ZYLBERSTEJN; ESTEVES, 2013; KOOTI et al., 2015). Dessa forma, o peso da hipófise é uma variável utilizada na avaliação da toxicidade reprodutiva, pois alterações no funcionamento dessa glândula podem comprometer o desenvolvimento e o funcionamento normal do sistema reprodutor masculino, interferindo com a produção de gametas e dos hormônios sexuais (MAHONY; HODGEN, 1995; EPA, 1996; ALY et al., 2015). Vários estudos já evidenciaram o efeito adverso de substâncias naturais no eixo HHT em ratos, causando alterações nos níveis de testosterona, relacionadas a uma redução no peso da hipófise nesses animais (SÁ et al., 2000). A hipófise dos animais tratados com as diferentes doses do EEKt não teve seu peso alterado, sugerindo que, em relação a esse parâmetro, o extrato não agiu como um desregulador endócrino e não induziu anormalidades reprodutivas.

A dosagem dos níveis séricos de testosterona também constitui um importante fator para a avaliação do funcionamento do sistema reprodutor masculino, visto que sua adequada produção é essencial para a manutenção da espermatogênese, desenvolvimento de órgãos andrógeno-dependentes, além das características sexuais masculinas (O'DONNELL et al., 2001; VALENTI et al., 2013; KOOTI et al., 2015; DA SERVA ROCHA et al., 2015).

Entre as principais classes de fitoestrógenos, as lignanas aparecem como substâncias associadas ao comprometimento da fertilidade em machos, devido às suas propriedades anti-androgênicas e à sua capacidade de reduzir os níveis plasmáticos de testosterona (ADLERCREUTZ et al., 1987; RASHED et al., 2014).

Em relação à *K. tomentosa*, não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos de testosterona nos grupos tratados com o EEKt. Esses resultados corroboram a ausência de alterações nos pesos dos órgãos dependentes de testosterona, como o epidídimo e vesícula seminal, pois uma diminuição no peso de órgãos reprodutores pode estar associada à diminuição dos níveis séricos de testosterona, uma vez que sua produção é realizada por células especializadas, presentes nos testículos (células de Leydig) (PEROBELLI, 2012).

A exposição de ratos adultos ao EEKt, durante período correspondente ao seu ciclo espermatogênico, não induziu alterações no trato reprodutor de ratos Wistar, sugerindo ausência de efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutor masculino, bem como ausência de efeito desregulador endócrino.

A avaliação da concentração e da qualidade dos espermatozoides é essencial para a interpretação do potencial tóxico de uma determinada substância no processo reprodutivo. Dados que indicam diminuição do número e da produção diária desses gametas, bem como o aumento da concentração de gametas anormais, além de alterações na morfologia espermática, refletem mutagenicidade das células germinativas (BLAZAK; ERNST; STEWART, 1985; ZENICK et al., 1994; EPA, 1996; TELLEZ-LÓPEZ et al., 2014). Além disso, a exposição de gametas a um agente genotóxico pode interferir na sua capacidade de mobilidade e fecundação, posto que alterações que aceleram ou retardam o tempo de trânsito dos espermatozoides através do epidídimo têm um importante papel na maturação dos espermatozoides, podendo modificar os parâmetros seminais, como a quantidade, a morfologia e a motilidade desses gametas (KLINEFELTER, 2002; FERNANDEZ et al., 2007; ALLAN et al., 2009; AUTA, HASSAN; 2016).

A avaliação da morfologia espermática é um instrumento útil para a detecção de toxicidade espermática e está associada a aspectos estruturais dos espermatozoides, podendo identificar anormalidades na cabeça e/ou na cauda do gameta (ZENICK et al., 1994). Vários estudos sugerem que espermatozoides anormais podem ser incapazes de alcançar a tuba uterina, ou de fertilizar o ovócito, sendo esse achado agravado de acordo com o aumento do número de espermatozoides anormais na ejaculação (NESTOR; HANDEL, 1984; REDI et al., 1984; MARQUES et al., 2016).

Garza e colaboradores (2015) estudaram os efeitos do extrato metanólico de plantas do norte do México (*Tagetes lucida* Cav., *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Lippia graveolens* H.B.K. e *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) sobre a morfologia testicular e qualidade espermática, em ratos Wistar, e observaram diminuição da concentração, mobilidade e viabilidade dos espermatozoides em todos os grupos tratados, comprometendo a fertilidade em machos.

Nesse trabalho, a produção e a morfologia dos gametas não foram modificadas pelo tratamento com o EEKt, considerando que as proporções de espermatozoides normais e anormais foram comparativamente semelhantes entre os animais dos grupos controle e tratados. A ausência de alterações sobre a massa e morfologia dos órgãos reprodutivos corrobora a ideia de que o EEKt não possui ação contraceptiva em ratos, pois, nessa espécie, reduções das massas do testículo e do epidídimo são indicadores que revelam queda de fertilidade ou atividade contraceptiva (QUIAN, 1984; JAHN; GÜNZEL, 1997; GUPTA et al., 2001; DIMECH, 2006; SAENPHET; JITJAINGAN; CHAIYAPO, 2015).

A regulação hormonal do processo reprodutivo feminino envolve principalmente o eixo hipotálamo-hipófise-ovário, sendo que em cada um desses níveis, ocorre a produção e liberação de estrogênio e de progesterona (MARCONDES, 2012; MONTENEGRO, 2012; ARRUDA, 2013). A progesterona exerce um papel fundamental na manutenção da gravidez, por que no início da gestação, esse hormônio estimula as glândulas do oviduto e do endométrio a secretarem nutrientes necessários à sobrevivência do zigoto, além de ser o hormônio responsável pelo estabelecimento e sustentação do feto no útero (BLISS et al., 2010).

Muitos estudos demonstraram a ação de plantas medicinais de uso popular no eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Por exemplo, o extrato aquoso de ***Momordica charantia* L., planta utilizada principalmente por sua atividade** hipoglicemiante, exerce efeito de desregulador endócrino ao causar diminuição dos níveis séricos de estradiol e de progesterona em ratas (ADEWALE; ODUYEMI; AYOKUNLE, 2014). Em outro trabalho, o tratamento de ratas com o extrato das sementes de *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming, conhecida por suas propriedades antipiréticas, antibacteriana, antiviral e hipoglicemiante, revelou sua atividade

antiestrogênica, através da ocorrência de efeitos adversos sobre o ciclo estral, órgãos reprodutores (ovários e útero) e perfil hormonal dos grupos tratados, agindo provavelmente através da inibição da secreção de estrogênio (SALUNKE; AHMED; MARIGOUDAR; 2011).

A administração da maior dose (2000 mg/kg) do EEKt no período de pré-implantação levou ao aumento da massa absoluta, mas não da massa relativa, da hipófise de ratas tratadas. Esse resultado pode ser indicativo de uma possível ação do extrato sobre a hipófise e a síntese hormonal, contudo é importante ressaltar que, durante a gestação de mamíferos, em consequência da estimulação estrogênica, é normal que ocorra um aumento natural da hipófise, que pode variar entre 30 a 100% do seu peso, levando a uma hiperplasia (HEITHAUER et al., 1990). Além disso, o aumento do peso da hipófise não interferiu com o seu peso relativo e nem na produção hormonal, pois os níveis séricos de progesterona, assim como o peso do ovário e o número de corpos lúteos não diferiram entre os grupos tratados e controle, demonstrando ausência de efeito antiestrogênico, no que diz respeito à produção de progesterona pelos ovários.

Na pós-implantação e lactação, como o peso dos ovários e o peso da hipófise não sofreram alterações pelo tratamento, pode-se sugerir a ausência de alteração hormonal considerável nas progenitoras tratadas com o EEKt, uma vez que o peso de corpos lúteos está correlacionado com os níveis de progesterona circulante, que é o principal hormônio envolvido na manutenção da gestação. (SILVA, 2010).

O teste do letal dominante consiste em um método realizado para detectar os efeitos mutagênicos de determinadas substâncias em machos ou fêmeas, através da avaliação de interferências sobre as células germinativas, durante o processo espermatogênico ou ovogênese, respectivamente, com o potencial de ser letal para a prole. Durante a realização desses ensaios, os animais são expostos ao composto teste e, posteriormente, acasalados para a avaliação da fertilidade masculina ou feminina (BEÇAK; RIBEIRO, 1984; EPA, 1996; KOTA et al., 2013). Esses ensaios também permitem a avaliação de taxas reprodutivas, que são indicadores importantes do potencial tóxico de uma determinada substância sobre a reprodução, podendo inclusive

identificar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos ocorrem (OSWEILLER, 98; CASTRO; MELLO; MELLO, 2005; TIWARI; VANAGE, 2013).

Não foram registradas diferenças significativas no índice de acasalamento das fêmeas acasaladas com machos tratados e das fêmeas tratadas nas fases de pré-implantação, pós-implantação e lactação com o EEKt, sugerindo que o tratamento não induziu a diminuição ou perda da libido nesses animais e, dessa forma, não alterou o comportamento sexual, 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. Contudo, Amman (1982) relata que, em ratos, é necessário que haja uma diminuição superior a 60% na produção de espermatozoides normais para que ocorra uma redução nas taxas de acasalamento, sugerindo, portanto que a análise isolada desse parâmetro, não é um dado seguro para a avaliação da fertilidade nesses animais.

A exposição masculina a um agente tóxico específico pode trazer prejuízos aos seus descendentes (DAVIS et al., 1992; COLIE, 1993; SAVITZ et al., 1994). Já é bem documentado que a passagem de toxicantes do pai para a mãe pode acontecer 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; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

As perdas pré-implantação estão associadas ao número de ovócitos liberados, porém que não foram implantados após a fertilização. O uso de substâncias contendo constituintes tóxicos, durante essa fase, pode induzir falhas no processo de implantação do embrião, comprometendo assim o desenvolvimento embrionário (ALMEIDA, LEMONICA; 2000; LIMA; SOUZA, 2009; PARK et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016). Já o índice de implantação reflete o sucesso da implantação do blastocisto no endométrio. Em contraste, a presença de reabsorções é indicativa de falha no desenvolvimento embrionário, e as perdas pós-implantação representam o prejuízo

reprodutivo total provocado no período de prenhez (FORD, 1982; BORGES, 2005; MÜLLER, 2007; SANTOS et al., 2016).

Estudos têm mostrado a influência de desreguladores endócrinos associados à indução de efeito mutagênico em células germinativas de ratos e ratas, comprometendo as funções do sistema reprodutor e prejudicando a fertilidade (TIWARI; VANAGE, 2013; ADEWALE; ODUYEMI; AYOKUNLE, 2014).

Nas fêmeas acasaladas com ratos tratados, não foram observadas diferenças significativas no número de corpos lúteos, implantações e reabsorções, justificando a ausência de alterações nos índices de perdas pré-implantação, pós-implantação e gestação, sugerindo que o extrato não compromete a fertilidade de ratos Wistar, e nem tem efeitos mutagênicos nesses animais. Resultados semelhantes foram encontrados por Sá e colaboradores (2006), ao demonstrarem que a administração do extrato hidroalcoólico de *Mikania glomerata* Spreng. a ratos Wistar não prejudicou a fertilidade, nem induziu efeito mutagênico nesses animais, evidenciado pela ausência de anormalidades nos parâmetros reprodutivos avaliados, incluindo os índices de acasalamento, gestação, perdas pré-implantação e implantação.

Nas ratas tratadas no período de pré-implantação embrionária, embora o número de corpos lúteos, implantações e reabsorções, além dos índices de acasalamento e de gestação terem se apresentado normais, evidenciou-se o aumento significativo do índice de perdas pré-implantação e a redução do índice de implantação na maior dose do EEKt (2000 mg/kg). Estes dados sugerem que o EEKt, na maior dose testada, pode induzir toxicidade reprodutiva em ratas, durante o período de pré-implantação, sugerindo um possível efeito embriotóxico e o comprometimento da capacidade reprodutiva de fêmeas expostas ao extrato. Resultado semelhante foi observado em ratas tratadas, durante o período de pré-implantação embrionária, com o extrato hidroalcoólico de *P. huberi*, que apresentaram indícios de toxicidade reprodutiva, evidenciada pelo aumento das perdas pré-implantação, além da diminuição de implantes uterinos e aumento do número de reabsorções (ROCHA et al., 2012).

O número de perdas pós-implantação corresponde ao prejuízo reprodutivo total provocado no período gestacional. Em ratas, esse parâmetro pode ser obtido pela diferença entre o número de implantes uterinos e o número de filhotes

nascidos vivos, resultando assim no quantitativo das mortes embrionárias, ou seja, do número de reabsorções, sendo estas avaliadas pela observação de embriões mortos, de restos embrionários ou apenas pelo resíduo de uma implantação (EPA, 1996; MÜLLER, 2007). Nas ratas tratadas na pós-implantação e lactação, observou-se aumento significativo dos índices de perdas pós-implantação das ratas que receberam o extrato nas doses de 500 e 2000 mg/kg, sugerindo que o EEKt pode interferir de forma negativa na homeostase materna e comprometer o desenvolvimento dos fetos, nas condições estudadas.

Müller e colaboradores (2009) mostraram que a administração do extrato de *Morinda citrifolia* Linn - planta conhecida por suas propriedades farmacológicas - a ratas no período de pós-implantação e lactação levou ao aumento de 74% do índice de perdas pós-implantação, indicando toxicidade reprodutiva dessa planta. Em pesquisa realizada com o extrato de *Coleus barbatatus* (Andr.) Benth, planta conhecida pela sua ação abortiva, foi observado, em ratas tratadas durante os períodos de pré-implantação e pós-implantação, aumento do número de perdas pré-implantação, além de retardo no desenvolvimento fetal (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000). Ainda, a administração em ratas, no período de pré-implantação, do extrato de *Salvia fruticosa* Mill, planta rica em taninos, um metabólito secundário também presente nas raízes de *Krameria tomentosa* aumentou o número de reabsorções e reduziu o número de fetos viáveis (ELBETIEHA et al., 1998).

O índice de nascimento reflete a relação entre o número de filhotes nascidos vivos e o número total de filhotes nascidos (DE SOUSA FERREIRA et al., 2013). A exposição de ratos ao EEKt, nas diferentes doses testadas, não interferiu no nascimento dos filhotes, nem alterou a viabilidade da prole das fêmeas acasaladas com esses animais. De forma semelhante, nas ratas tratadas com as diferentes doses do EEKt, durante o período de pós-implantação e lactação, esses parâmetros apresentaram-se normais, assim como o índice de acasalamento e o índice de gestação. Entretanto, foi registrado decréscimo do índice de desmame para as ratas acasaladas com ratos tratados e ratas tratadas na pós-implantação e lactação, expostos às doses de 500 e 2000 mg/kg do extrato. Este fato pode estar relacionado à ocorrência de mortes de filhotes, verificada durante o período de lactação, pois até

aproximadamente a segunda semana pós-natal, a prole alimenta-se exclusivamente de leite materno, sendo esta, uma fase crucial para o devido crescimento e sobrevivência dos neonatos (TUCKER et al., 1994; DE SOUSA FERREIRA et al., 2013). Dessa forma, a concorrência pela amamentação pode ter dificultado a adequada nutrição da progênie, reduzindo assim o número de filhotes vivos no desmame.

A avaliação de teratogenicidade em ratos expostos durante o período gestacional refere-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; MÜLLER et al., 2007).

De acordo com o EPA (1996), as anormalidades estruturais podem ser indicativas de toxicidade do desenvolvimento. No presente estudo, nenhum feto malformado foi observado durante a avaliação macroscópica externa dos descendentes de progenitoras acasaladas com ratos expostos ao EEKt e na prole de ratas tratadas na pós-implantação e lactação, indicando ausência de toxicidade no desenvolvimento nas fases estudadas. Porém, a ausência de anormalidades morfológicas nos descendentes não descarta a presença de toxicidade materna ou paterna, refletida na prole, visto que o tratamento com o EEKt, durante o período de organogênese e lactacional alterou parâmetros reprodutivos importantes, o que torna necessária a realização de ensaios específicos para malformações fetais para uma avaliação mais precisa desses resultados.

Os cuidados maternos no período pós-parto (lactacional) têm sido associado ao bom desenvolvimento da prole, influenciando inclusive no desenvolvimento neurocomportamental dos filhotes, posto que na maioria das espécies, os descendentes são imaturos ao nascimento (CHAMPAGNE et al., 2003; CASTRO; CHIORATO; PINTO, 2000; STEDILE et al., 2015)

Para a avaliação do desenvolvimento da prole de ratas não tratadas e acasalados com machos tratados e prole de ratas tratadas com o EEKt, foram utilizados

parâmetros, tais como desenvolvimento geral, peso corporal, abertura dos olhos, descolamento e abertura dos pavilhões auriculares, aparecimento de lanugo e pelos, erupção dos incisivos superiores, abertura do canal vaginal ou descida dos testículos, análise comportamental e reflexológica, além do índice de desmame.

Durante a gestação, o peso das ninhadas pode ser influenciado por fatores que incluem a capacidade intrauterina, tamanho da ninhada e duração da gestação. Após o nascimento, durante o aleitamento materno, tanto a massa corporal quanto o desenvolvimento geral da prole podem ser modificados pela habilidade das mães em amamentarem seus filhotes, bem como pela interferência de substâncias tóxicas a que as crias foram expostas *in utero* e através do aleitamento materno (EPA, 1996; MELLO, 2001). O peso da prole de ratas acasaladas com ratos tratados e o peso da prole das ratas tratadas com as doses de 125, 500 e 2000 mg/kg do EEKt não diferiram do grupo controle. Entretanto, alguns filhotes apresentaram-se aparentemente desnutridos, o que embora não tenha modificado o desenvolvimento ponderal da prole, pode ter se refletido na redução do número de descendentes vivos ao desmame, nas doses de 500 e 2000 mg/kg, em relação ao grupo controle, nos dois protocolos experimentais estudados. Esse resultado pode ter sido influenciado, em parte, pelo número de filhotes de cada mãe, que devido à concorrência pela amamentação, reduzindo a oferta de leite a cada cria, e pela ocorrência de fatores relacionados às condições fisiológicas e ambientais, capazes de alterar a ejeção do leite. É relevante considerar que, até aproximadamente o 8º ± 2 dias pós-natal, a progênie alimenta-se exclusivamente de leite materno, e só após este período, consegue se alimentar de ração, ainda com certo grau de dificuldade, devido à sua fragilidade musculoesquelética nesse período inicial de vida (MÜLLER, 2007).

Embora os resultados da prenhez apontem para toxicidade do EEKt no desenvolvimento pré-natal dos descendentes de ratos e ratas tratadas, quando comparado ao grupo controle, não foram evidenciados efeitos adversos sobre a maioria dos parâmetros de desenvolvimento geral dos filhotes (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).

O tempo médio para a abertura do canal vaginal e para a descida bilateral dos testículos até a bolsa escrotal são eventos hormônio-dependentes, portanto a ocorrência de alterações na produção hormonal pode repercutir no aparecimento dessas características sexuais (MABLY; MOORE; PETERSON, 1992). Por exemplo, a exposição de ratas grávidas à associação do antifúngico itraconazol e o agente imunoestimulante β -glucana causou retardo em alguns indicadores de desenvolvimento físico dos filhotes, incluindo a descida do testículo e abertura vaginal, indicando a potencial ação do itraconazol como desregulador endócrino durante o desenvolvimento da prole (STEDILE et al., 2015). Quanto ao EEKt, não foi encontrada nenhuma mudança significativa no tempo de aparecimento desses parâmetros, entre os grupos controle e tratados, indicando que o extrato não interferiu no desenvolvimento sexual da prole provenientes de mães e pais tratados.

Esses dados sugerem ausência de toxicidade paterna e materna 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. No entanto, estudos complementares devem ser feitos a fim de melhor caracterizar o potencial tóxico do EEKt sobre a prole, visto que houve redução estatisticamente significativa no número de descendentes vivos ao desmame.

Os reflexos são respostas involuntárias que surgem a partir de uma estimulação externa pré-estabelecida e precisa, e compreendem as primeiras formas de movimento. Variações encontradas nesse parâmetro, como ausência, presença, grau de intensidade e simetria, podem ser usadas para avaliar a integridade do sistema nervoso central e para detectar anormalidades periféricas, como alterações músculoesqueléticas congênitas ou lesões nervosas (SMART; DOBBING, 1971; MUSIENKO et al.; 2010). O padrão de maturação dos reflexos, portanto, pode indicar uma adequada maturação do sistema nervoso central durante o desenvolvimento de um animal, sendo que o retardo do mesmo pode causar alterações nos processos sequenciais de desenvolvimento da atividade locomotora, como 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 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. Nessa investigação, na prole de ratas acasaladas com ratos tratados, foi registrado atraso no aparecimento dos reflexos de andar adulto e geotaxia negativa na dose de 2000 mg/kg, quando comparado ao grupo controle. Já os descendentes de ratas tratadas com o EEKt (2000 mg/kg) apresentaram retardo significativo no reflexo de geotaxia negativa. Embora a exposição paterna e materna ao EEKt tenha causado retardo na maturação física e no desenvolvimento dos filhotes, esses resultados tem pouca relevância biológica e clínica, já que posteriormente esses descendentes conseguiram desenvolver todos os reflexos normalmente, sem comprometimento físico e funcional, dentro do tempo esperado para a espécie estudada (SOUTO MAIOR et al., 2003).

A análise comportamental da prole proveniente de ratos e ratas tratados com as diferentes doses do EEKt foi feita através do teste do campo aberto, um modelo de avaliação do comportamento relacionado à ansiedade, que avalia o efeito de determinadas substâncias nas reações dos animais submetidos a situações de estresse. Portanto, os parâmetros avaliados no teste do campo aberto podem estar relacionados às respostas que remetem ao nível de emocionalidade do animal em experimentação, o que pode gerar estímulos excitatórios ou inibitórios sobre o sistema nervoso (NAHAS, 1999; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2004; STEDILE et al., 2015).

Estudos realizados por Costa-Silva e colaboradores (2006) salientaram que a administração do óleo de *Carapa guianensis* Aubl. a ratas prenhas causou alterações no parâmetro de ambulação espontânea da prole, evidenciada pelo aumento significativo da atividade motora, sugerindo uma possível ação central desse extrato. Em outro estudo, o tratamento de ratas, desde a gravidez até o período lactacional, com o antimoníaco de meglumina, provocou redução da frequência de levantar na prole feminina, quando submetidas a avaliação no campo aberto (COELHO, 2010). A administração do EEKt não induziu alterações significativas na ambulação,

comportamento de levantar, limpeza e defecação da prole, sugerindo que o extrato não alterou o grau de ansiedade e emocionalidade dos descendentes. Resultados semelhantes foram demonstrados na avaliação do desenvolvimento pós-natal da prole de ratos Wistar tratados com preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max* (L.) Merr, no qual o tratamento dos pais não comprometeu o desenvolvimento de sua progênie e nem alterou o grau de emocionalidade dos descendentes, evidenciado pela ausência de alterações nos parâmetros avaliados no campo aberto (HOLENBACH et al., 2010).

Conclusões e Perspectivas

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que, sob as condições experimentais utilizadas, o tratamento em dose única, de ratas Wistar com o extrato etanólico de *K. tomentosa* ou sua fração hexânica:

- ✓ Não interferiu na atividade motora, reflexa e no estado geral e de consciência dos animais;
- ✓ Não exerceu efeito depressor ou estimulante sobre o SNC dos animais;
- ✓ Não alterou a evolução ponderal;
- ✓ Não induziu letalidade;
- ✓ O EEKt e a FHEEKt apresentaram toxicidade oral aguda maior que 2000 mg/kg *pc.* classificados como substâncias de muito baixa toxicidade.

O tratamento de ratos Wistar, durante o período do ciclo espermatogênico, e de ratas Wistar, durante as fases de pré-implantação, pós-implantação e lactação, com o EEKt:

- ✓ Interferiu na evolução ponderal de ratos e de ratas tratadas durante o período lactacional, sugerindo a ocorrência de efeito tóxico sistêmico;
- ✓ Não induziu efeito tóxico direto sobre órgãos vitais e reprodutores dos animais;
- ✓ Não comprometeu a produção e a qualidade dos espermatozoides;
- ✓ Não interferiu com o acasalamento;
- ✓ Interferiu com os índices reprodutivos de pré-implantação e pós-implantação, afetando a habilidade reprodutiva de ratos e ratas;
- ✓ Não mostrou indícios de efeito desregulador endócrino;
- ✓ Interferiu no número de filhotes vivos ao desmame, sugerindo a ocorrência de efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole;

- ✓ Não interferiu sobre o desenvolvimento geral e comportamental da prole;
- ✓ Afetou o padrão de maturação de reflexos da prole paterna e materna;

8 PERSPECTIVAS

Embora o tratamento de ratas Wistar, a curto prazo, com o EEKt e com a FHEEKt, tenha demonstrado baixa toxicidade, os efeitos adversos observados em ratos e ratas Wistar, pela administração crônica do EEKt, durante fases específicas do ciclo reprodutivo, indicam que esse extrato pode provocar efeito tóxico sistêmico, sobre o sistema reprodutor e proles desses animais. Dessa forma, é necessária a realização de estudos adicionais, a exemplo da avaliação de exames anatomopatológicos e ensaios de teratogenicidade, para melhor caracterização do risco toxicológico dessa espécie vegetal sobre o sistema reprodutor.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; UTZ, W.; SÁNCHEZ, H. V.; TOUCHÉ, E. M. G.; VERDE, J.S.; DOMINGUEZ, X.A. Neolignans, Nor-neolignans and other Compounds from roots of *Krameria grayi*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2 p. 413-415, 1995.
- ADEWALE, O. O.; ODUYEMI, O. I.; AYOKUNLE, O. Oral administration of leaf extracts of *Momordica charantia* affect reproductive hormones of adult female Wistar rats. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, p. S521-S524, 2014.
- ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, p. 364 – 373, 2002.
- ADLERCREUTZ, H.; HÖCKERSTEDT, K.; BANNWART, C.; BLOIGU, S.; HÄMÄLÄINEN, E.; FOTSIS, T.; OLLUS, A. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). **Journal of steroid biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 1135-1144, 1987.
- ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; DOS SANTOS MIRANDA, M.; OHASHI, O. M. (2015). Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde= Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane structure. In: ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**, Nova York: Garland Science, Taylor & Francis Group, p. 617- 650, 2008.
- 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.
- ALLAN, J. J.; PORE, M. P.; DEEPAK, M.; MURALI, B.; MAYACHARI, A. S.; AGARWAL, A. Reproductive and fertility effects of an extract of *Andrographis paniculata* in male Wistar rats. **International journal of toxicology**, v. 28, n. 4, p. 308-317, 2009.
- ALLEGRIINI, P. R. Synopsis of the organ anatomy. In: KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000, p. 283 -319.
- ALMEIDA, E. R.; MELO, A. M.; XAVIER, H. Toxicological Evoluotion of Hydro-alcohol Extract of the Dry Leaves of *Peumus boldus* and Boldine in rats. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 2, p. 99-102, 2000.

ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 53-60, 2000.

ALY, H. A.; HASSAN, M. H.; EL-BESHBISHY, H. A.; ALAHDAL, A. M.; OSMAN, A. M. M. Dibutyl phthalate induces oxidative stress and impairs spermatogenesis in adult rat. **Toxicology and industrial health**, doi: 10.1177/0748233714566877, 2015.

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.

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação** – São Paulo (FAPESP): UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004.

ARÁUJO, E. J. F. D.; ARAÚJO, D. Y. L. D.; FREITAS, R. M. D.; FERREIRA, P. M. P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 361, 2015.

ARENA, A. C. **Parâmetros reprodutivos masculinos e fertilidade de ratos adultos expostos ao incetícida fenvalerato**. 2006. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ARRUDA, J. T. **Comparação entre dois protocolos para estimulação ovariana com agonista/antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em mulheres submetidas ao primeiro ciclo de reprodução assistida**. 2013. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ASHAFA, A. O. T.; OREKOYA, L. O.; YAKUBU, M. T. Toxicity profile of ethanolic extract of *Azadirachta indica* stem bark in male Wistar rats. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 10, p. 811-817, 2012.

AUTA, T.; HASSAN, A. T. Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of *Azadirachta indica* (neem) on male albino mice. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n.2, p. 111-115, 2016.

AUTHMAN, M. M. N.; IBRAHIM, S. A.; EL-KASHEIF, M. A.; GABER, H. S. Heavy metals pollution and their effects on Gills and liver of the Nile catfish *Clarias gariepinus* inhabiting El-Rahawy Drain, Egypt. **Global Veterinaria**, v. 10, n. 2, p. 103–115, 2013.

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.

AZIZ, M. H.; AGRAWAL, A. K.; ADHAMI, V. M.; SHUKLA, Y.; SET, P. K. Neurodevelopmental consequence of gestational exposure (GD14-GD20) to low doses of deltamethrin in rats. **Neuroscience Letters**, v. 300, p. 161-165, 2001.

BAKER, V. A. Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. p. 413-419, 2001.

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.

BARBOZA, G. E.; CANTERO, J. J.; NÚÑEZ, C.; PACCIARONI, A.; ESPINAR, L. A. Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. **Kurtziana**, v. 34, n 1-2, p. 7-365, 2009.

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: S. Oga, ed. 1996. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, p.60-70, 1996.

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

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

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: H.S. Spinosa, S.L. Gorniak, M.M. Bernardi, eds. 2002. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.691–699, 2002.

BHAGAVATHULA, A. S.; ELNOUR, A. A.; SHEHAB, A. Pharmacovigilance on sexual enhancing herbal supplements. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 1, p. 115-118, 2016.

- 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.
- BLISS, M. S.; NAVRATIL, A. M.; XIE, J.; ROBERSON, M. S. GnRH signaling, the gonadotrope and control of fertility. **Frontiers of Neuroendocrinology**, v. 31, p. 322-340, 2010.
- BOLL, K. M.; BORTOLASCI, C. C.; ZAMINELLI, T.; VERÍSSIMO, L. F.; BACCHI, A. D.; HIGACHI, L.; MOREIRA, E. G. *Passiflora incarnata* treatment during gestation and lactation: toxicological and antioxidant evaluation in Wistar dams. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 2, p. 353-359, 2014.
- BORGES, L. V.; CARMO, J. C. D.; PETERS, V. M.; LAS CASAS, L.; GUERRA, M. D. O.A. Toxicidade do *Hypericum perforatum* administrado a ratas prenhes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 206-208, 2005.
- BRASIL, 1996. Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. **Anexo I: Normas para estudo da toxicidade e da Eficácia de produtos fitoterápicos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116_96.htm>. [Acesso em 2 de Outubro de 2015].
- BRASIL, 2004. 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 15 de Outubro de 2015].
- BRASIL, 2010. **Guia para condução de estudos não-clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, G. Blood and milk composition in dairy ewes from southern Brazil: variations during pregnancy and lactation. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 942-948, 2006.
- 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.

BÚFALO, A. C. **Antidepressivo *Hypericum perforatum* I. sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos Wistar**. 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BUFFET, N. C.; BOUCHARD, P. The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. **Chronobiology international**, v. 18, n. 6, p. 893-919, 2001.

CANTARUTTI, T. F. P. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos Wistar**. 2005 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). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n.1, p. 37-64, 1986.

CASERTA, D.; DI SEGNI, N.; MALLOZZI, M.; GIOVANALE, V.; MANTOVANI, A.; MARCI, R.; MOSCARINI, M. Bisphenol a and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. **Reproductive Biology and Endocrinol**, v. 12, n. 1, p. 37, 2014.

CASTRO V. L.; CHIORATO S. H.; PINTO N. F. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, v. 118, p. 93-102, 2000.

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. 33, n. 3, p.265-269, 2005.

CASTRO, J. C. M. **Isolamento, identificação estrutural e estudo farmacológico de alguns dos constituintes de *Krameria tomentosa* A. St. Hill**. 1999. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa.

CHAMPAGNE, F. A.; FRANCIS, D. D.; MAR, A.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359-371, 2003.

CHAURET, D. C.; BERNARD, C. B., ARNASON, J. T.; DURST, T.; KRISHNAMURTY, H. G.; SANCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 152-155, 1996.

CHEN, W.; SHIELDS, J.; HUANG, W.; KING, J. A. Female fear: Influence of estrus cycle on behavioral response and neuronal activation. **Behavioral Brain Research**, v. 201, n. 1, p. 8-13, 2009.

CLARK, M. E.; MELLON, P. L. The POU homedomain transcription factor Oct-1 is essential for activity of the gonadotropin-releasing hormone neuron-specific enhancer. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p. 6191-6177, 1995.

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, v.1, p. 15-30, 2000.

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

COELHO, D. R. **Desenvolvimento somático, neurocomportamental e fertilidade da pôle de ratos exposta ao antimoniato de meglumina pela via transplacentária e leite materno**. 2010. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências na Área de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

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.

CORNELL CENTER FOR ANIMAL RESOURCES AND EDUCATION, 2006. CARE 101.01. Rodent_Anesthesia. [pdf]. New York: Cornell University. Disponível em:<http://www.umsl.edu/~tsytsarev/tsytsarev_files/Rodent_Anesthesia.pdf >. [Acesso em 19 de Outubro de 2013].

CORADIN, L. S.; JESUS, M. M.; FOCHI, R. A.; VILAMAIOR, P. S.; GÓES, R. M.; FELISBINO, S. L.; TABOGA, S. R.. Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 17, n. 3, p. 398-406, 2013.

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.

COW, C.; LEUNG, C.; CHARLTON, J. L. Antiviral activity of aryl-naphthalene and aryl-dihydronaphthalene lignans. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 78, n. 5, p. 553-561, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

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, p. 389-403, 2002.

CUNHA, L. C. D.; MELO, D. F. D. A.; PEREIRA, M. E.; MELO, D. D. S.; PARENTE, L. L.; SILVA, M. A. C.; GONZAGA, L. Q. D. S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 357-362, 2013.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 403-411, 2009.

DA SERVA ROCHA, E. I. R.; BEZERRA, J. C.; TEIXEIRA, J. E. R. P. I. V. A.; BELLEI, P. M.; REIS, J. E.; PETERS, V. M.; DE OLIVEIRA GUERRA, M. Effect of *Ginkgo biloba* extract on F1 generation of male Wistar rats during fetogenesis. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 43, p. 1081-1088, 2015.

DA SILVA FILHO, A. A.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.; NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, J. K. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 10, p. 1307-1310, 2008.

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.

DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. G.; VOLPATO, G. T.; CONSONNI, M.; RUDGE, M. V. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. **Anomalias Congênitas - Estudos Experimentais**. COOPMED, Ed. Médica, Belo Horizonte - MG, 1ª ed., p.102, 2008.

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.

DE ALMEIDA, E. R.; LUCENA, F. R. S.; SILVA, C. V. N. S.; DA SILVA COSTA-JUNIOR, W.; CAVALCANTI, J. B.; COUTO, G. B. L.; DA SILVA, A. C. P. Toxicological assessment of beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 9, p. 1276-1280, 2009.

DE SOUSA FERREIRA, M. D.; LIMA, D. C. P.; MOURA, E. R.; DE SOUSA MULLER, J. B. B.; DAS CHAGAS CARDOSO FILHO, F.; DE SOUSA SILVA, S. M. M.; DE SOUZA BATISTA, M. D. C. Avaliação da toxicidade crônica e gestacional do extrato etanólico de *Buchenavia sp.*, em ratas Wistar. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 319-326, 2014.

DE SOUZA, V. A.; DA SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. D. A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; BASTOS, J. K. (2005). Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 2, p. 303-307, 2005.

DE SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

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.

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.

DOMINGUEZ, X. A.; VEGA, H. S.; ESPINOSA, G. C.; VERDE, J. S.; ACHENBACH, H.; UTZ, W. Lignans and Nor-neolignans from *Krameria interior*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2651-2653, 1990.

DOS SANTOS, A. H.; RAMOS, A. C.; SILVEIRA, K. M.; KISS, A. C. I.; LONGHINI, R.; DINIZ, A.; GERARDIN, D. C. C. The exposure to *Trichilia catigua* (catuaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. **Journal of ethnopharmacology**, v. 166, p. 86-91, 2015.

DUKES, H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. The spermatozoon. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**, v. 1, p. 3-54, 2006.

ELBETIEHA, A.; AL-HAMOOD, M. H.; ALKOFABI, A.; BATAINEH, H. Reproductive toxicity potentials of *Salvia fruticosa* (Labiatae) in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 67-74, 1998.

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.

FARIA, D. E. P.; BORGES, L. V.; PETERS, V. M.; REIS, J. E. P.; RIBEIRO, L. C.; SÁ, 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.

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 Outubro de 2015].

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.

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.

FOX, S. I. **Fisiologia Humana**. 7ª ed. São Paulo: Manole, 2007.

FRAIETTA, R.; ZYLBERSTEJN, D. S.; ESTEVES, S. C. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. **Clinics**, v. 68, p. 81-88, 2013.

GARZA, R. G.; LOPEZ, M. A. T.; PEREZ-VERTTI, R. D. A.; ORASMA, C. L.; MARTINEZ, J. M. Testicular damage in Wistar rats caused by methanolic extracts of plants from the North of Mexico. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 25, p. 724-730, 2015.

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.

GIMENES, M.; LOBÃO, C. S. A polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (Krameriaceae) por abelhas (Apidae) na restinga, BA. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 440-445, 2006.

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.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GONZALEZ, G. P. L. **Efeitos da associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia sobre aspectos comportamentais, lipídeos séricos e o desenvolvimento corporal de ratas adultas**. 2010. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GORE, A. C. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. **Frontiers Neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 358-374, 2008.

GORE, A. C.; WALKER, D. M.; ZAMA, A. M.; ARMENTI, A. E.; UZUMCU, M. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 12, p. 2157–2168, 2011.

GRAY, L. E.; WILSON, V.; NORIEGA, N.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; STOKER, T. E.; LAWS, S. C.; GOLDMAN, J.; COOPER, R. L.; FOSTER, P. M. D. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 45, p. 425-437, 2004.

GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Uterotonic Plants and their Bioactive Constituents. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p. 207-220, 2011.

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.; DOBHALL, 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.

GUYTON, A. M.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAI, Y.; HOU, J.; LIU, Y.; LIU, Y.; YANG, H., LI, Z.; HE, Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2014. v. 29, p. 66-75.

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.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 155, p. 217-223, 2015.

HARABAWY, A. S. A.; IBRAHIM, A. T. A. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): hematological, biochemical and cytogenetic response. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 103, p. 61-67, 2014.

HASCHEK, W.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. Female reproductive system. In: **Fundamentals of toxicologic pathology**. San Diego: Academic Press, 2010, p.599-631.

HAYWARD, S. W.; BASKIN, L. S.; HAUGHNEY, P. C.; FOSTER, B.A.; CUNHA, A. R.; DAHIYA, R.; PRINS, G. S.; CUNHA, G. R. Stromal development 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 embryology of the laboratory rat. Wörthersee: **BioMed Verlag**, p. 270, 1986.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. Female reproductive organs. In: _____. **Anatomy of the laboratory rat**. Baltimore: Waverly Press, 1976, p. 76-82.

HEITHAUER, B.W.; SANO, T.; KOVACS, K.T.; YOUNG, W.F.; RYAN, N.; RANDALL, R.V. The pituitary gland in pregnancy: a clinicalpathologic and immunohistochemical study of cases. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 65, p. 461-474, 1990.

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.

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.

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

JAHN, A. I.; GUNZEL, 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.

JOHN, J. E. Natural products as lead structures: a role for biotechnology. **Drug Discovery Today**, 15, p.11-12; 2010.

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.

KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; LERTPRASERTSUKE, N.; TAESOTIKUL, T.; RUJJANAWATE, C.; KAEWPINIT, D.; PITASAWAT, B. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L.(Proh Hom). **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, n. 2, p. 359-365, 2004.

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.

KEMPINAS W. D. G.; KLINEFELTER G. R. The Epididymis as a Target for Toxicants. **Comprehensive Toxicology**. v. 11, p. 149-66, 2010.

KIGUTI L. R. A.; PUPO A. S. Investigation of the Effects of $\alpha 1$ -Adrenoceptor Antagonism and L Type Calcium Channel Blockade on Ejaculation and Vas Deferens and Seminal Vesicle Contractility In Vitro. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n.1, p. 159-168, 2012.

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.

KLINEFELTER, 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.

KNOPP, R. H.; BERGELIN, R. O., WAHL, P. W.; WALDEN, C. E.L. Effects of pregnancy, postpartum lactation, and oral contraceptive use on the lipoprotein cholesterol/triglyceride ratio. **Metabolism**, v. 34, n. 10, p. 893-899, 1985

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

KOOTI, W.; GHASEMI-BOROON, M.; GHAFOURIAN, M.; ASADI-SAMANI, M.; HARIZI, M.; SHARAFI-AHVAZI, N.; AFRISHAM, R. The effects of celery leave extract on male hormones in rats. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 56-60, 2015.

KOTA, N.; PANPATIL, V. V.; VISHNUVARDHAN RAO, M.; POLASA, K. Effect of feeding turmeric on benzo (a) pyrene induced dominant lethal mutations. **Journal of Genetics Study**, v. 1, n. 1, p. 2, 2013.

KRSMANOVIC, L. Z.; MORES, N.; NAVARRO, C. E.; ARORA, K. K.; CATT, K. J. Na agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2969-2974, 2003.

KUNTZE, L. B.; KONDO, A. K.; BEZERRA, B. T. S.; PINTO, T.; CAMARGO, I. C. C. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* CA Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n.1, p. 34-42, 2012.

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

LAYMAN, L. C. Hypogonadotropic hypogonadism. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 283-296, 2007.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAU M, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565-575, 2011.

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.

LEITE, R. M. P. **Ciclo estral e menstrual: repercussão da agressão nutricional precoce sobre parâmetros locomotores em ratas e consequências sobre as propriedades neuromecânicas em mulheres jovens**. 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LEMÔNICA I. P.; OGA, S.; CAMARGO M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. Editora Atheneu, v. 3, p. 59-71, 2008.

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.

LENT, E. M.; CROUSE, L. C.; WALLACE, S. M.; CARROLL, E. E. Peri-pubertal administration of 3-nitro-1, 2, 4-triazol-5-one (NTO) affects reproductive organ development in male but not female Sprague Dawley rats. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 1-9, 2015.

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

LEVI-SETTI, P. E.; CAVGNA, M.; BAGGIANI, A.; ZANNONI, E.; COLOMBO, G. V.; LIPRANDI, V. FSH and LH together in ovarian stimulation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 115, n.1, p. S34-S39, 2004.

LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne e Levy, fundamentos da fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e Sobrevivência de Embriões no Período de Préimplantação: Enfoque em Ruminante. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 194-202, 2009.

LIMA, C. M. P.; SOARES, R. P. F.; BASTOS, I. V. G. A.; GRANGEIRO, A. R. S.; GURGEL, A. P. A. D.; SILVA, A. C. P.; SOUZA, I. A. Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 4, p. 832-838, 2014.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, v. 6, p. 1-148, 1922.

LUCIO, E. D. A.; ROSALEN, P. L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A. R. M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, n. 1, p. 23-35, 2000.

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.

MACHADO DE OLIVEIRA, R. E.; COIMBRA, M. C.; SIQUEIRA, J. M. Análise e monitoramento da qualidade de produtos farmacêuticos contendo *Hypericum perforatum* L. comercializados em Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 313-317, 2014.

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

MADEIRO, S. A.; DE LUCENA, H. F.; SIQUEIRA, C. D.; DUARTE, M. C.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M.; TAVARES, J. F. New Neolignans from *Krameria tomentosa* A. St.Hill. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2021-2026, 2012.

MAEDA, K. I.; OHKURA, S.; TSUKAMURA, H. Physiology of reproduction. In: KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000, p. 145 -176.

MAFFUCCI, J. A.; GORE, A. C. Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 274, p. 69-127, 2009.

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.

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.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the strous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MARCONDES, R. R. **Efeitos da exposição neonatal a esteróides sexuais no hipotálamo e ovário de ratas adultas: modelos animais da síndrome dos ovários policísticos**. 2012. Dissertação (mestrado). Programa de Obstetrícia e Ginecologia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

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.

MARQUES, R. M.; BRANDÃO, M. A. F.; OSHIO, L. T.; PETERS, V. M.; DE OLIVEIRA GUERRA, M. Abnormality of spermatozoa in Wistar rats exposed to high doses of Valeriana officinalis L. aqueous suspension. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 4, p. 35-46, 2016.

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.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.

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.

MATTARAIA, V. G. M. **Eficiência reprodutiva de ratos Wistar: sincronização, restrição alimentar e sistemas de produção**. 2007. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

McDONALD, L. E.; PINEDA, M. H. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989.

.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.

- 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.
- 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.
- MESSINIS, I. E. Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. **Human reproduction update**, v. 12, n. 5, p. 557-571, 2006.
- MICHALAKIS, K. G.; SEGARS, J. H. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 1949-1957, 2010.
- MONTENEGRO, I. S. **Avaliação da estimulação ovariana com uso de análogos do GnRH**. 2012. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia Orientada para a Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- MORAES, G. E. S. **Espermocitograma**. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 1994. cap. 2, p. 61-93.
- MOTTA, L. S. G. D. **Toxicidade aguda, neurotoxicidade reprodutiva e embriotoxicidade do chá ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) em ratas Wistar**. 2014. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília.
- MÜLLER, J. C. **TOXICIDADE REPRODUTIVA DA *Morinda citrifolia* Linn**. 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- MÜLLER, J. C.; BOTELHO, G. G.; BUFALO, A. C.; BOARETO, A. C.; RATTMANN, Y. D.; MARTINS, E. S.; DALSENTER, P. R. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): in vivo and in vitro reproductive toxicology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 229-233, 2009.
- MUSIENKO, P. E.; ZELENIN, P. V.; ORLOVSKY, G. N.; DELIAGINA, T. G. Facilitation of postural limb reflexes with epidural stimulation in spinal rabbits. **Journal of neurophysiology**, v. 103, p. 1080-1092, 2010.
- NAHAS, T. R. O teste do Campo Aberto. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo, Editora Plêiade, p. 197-215. 1999.
- NAOR, Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 10-29, 2008.
- NAOR, Z.; CHILDS, G. V. Binding and activation of gonadotropin-releasing hormone receptors in pituitary and gonadal cells. **International Review of Cytology**, v. 103, p. 147-187, 1986.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.22-29.
- NESTOR, A.; HANDEL, M. A. The transport of morphologically abnormal sperm in the female reproductive tract. **Gamete Research**, v. 10, p. 119-126, 1984.
- NETO, J. N.; ALMEIDA, A. A. C.; SILVA, O. A.; CARVALHO, R. B. F.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do nerolidol em camundongos. **Revista Biofar**, v. 8, n. 2, p. 42-56, 2012.
- 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 2013.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2001. OECD- GUIDELINE 423: **Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method**. [PDF]. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf. [Acesso em 19 de Outubro de 2014].

OHKURA, S.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K-I. Endocrinology. In: KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 401-418.

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, M. S.; FERNANDES, M. Z. L.; MINEIRO, A. L. B.; DOS SANTOS, R. F.; VIANA, G. E.; COELHO, J. M.; FERNANDES, R. M. Toxicity effects of ethanol extract of *Simarouba versicolor* on reproductive parameters in female Wistar rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 8, p. 221-235, 2016.

OLIVEIRA, R. J.; PESARINI, J. R.; SALLES, M. J. S.; KANNO, T. Y. N.; LOURENÇO, A. C. D. S.; LEITE, V. D. S.; MANTOVANI, M. S. Effects of β -glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 1, p. 111-119, 2014.

OLIVEIRA, T. S.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E. F.; SERAKIDES, R. Histomorfometria e histoquímica da tuba uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 448-456, 2005.

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.

PARENT, A. S.; NAVEAU, E.; GERARD, A.; BOURGUIGNON, J. P.; WESTBROOK, G. L. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews**, v. 14, n. 5-7, p. 328-349, 2011.

PARK, M. R.; GURUNATHAN, S.; CHOI, Y. J.; KWON, D. N.; HAN, J. W.; CHO, S. G.; KIM, J. H. Chitosan nanoparticles cause pre-and postimplantation embryo complications in mice. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 4, p. 88, 2013.

PARK, S.; KIM, S.; JIN, H.; LEE, K.; BAE, J. Impaired development of female mouse offspring maternally exposed to simazine. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 845-851, 2014.

PÉREZ-GUTIÉRREZ, S.; SÁNCHEZ-MENDOZA, E.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, D.; ZAVALA-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ-GONZÁLEZ, C. Kramecyne—a new anti-inflammatory compound isolated from *Krameria cytisoides*. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 2049-2057, 2012.

PEROBELLI, J. E. **Morfofisiologia do sistema genital masculino de ratos púberes e adultos após privação androgênica durante a pré-puberdade**. 2012. Tese (doutorado). Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PETIT, F. M.; SERRES, C.; BOURGEON, F.; PINEAU, C.; AUER, J. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. **Human Reproduction**, v. 28, n. 4, p. 852-865, 2013.

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.

RASHED, M. M.; SHALLAN, M.; MOHAMED, D. A.; FOUUDA, K.; HANNA, L. M. Biological Evaluation of Anti-androgenic Effect of Some Plant Foods. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 9, p. 645-651, 2014.

- RASWEILER IV, J. J.; BADWAIK, N. K. Discoidal Placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, v. 1, p. 890-902, 1999.
- RATO, L, ALVES, M. G.; SOCORRO S.; DUARTE A. I.; CAVACO, J. E.; OLIVEIRA, P. F. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330-338, 2012.
- RAVE-HAREL, N. ; GIVENS, M. L.; NELSON, S. B.; DUONG, H. A.; COSS, D.; CLARK, M. E.; HALL, S. B.; KAMPS, M. P.; MELLON, P. M. TALE homeodomain proteins regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression independently and via interactions with Oct-1. **Journal of Chemical**, v. 279, n. 29, p. 30287-30297, 2004.
- 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.
- RIBEIRO, F. P. R. A. **Investigação da atividade espasmogênica de *Erythroxylum caatingae* Plowman em útero isolado de rata**. 2013. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.
- 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. D. O. B.; SOUSA, L. D. Q.; MOTA, C. D. A. X.; SANTOS, E. C. S.; DINIZ, M. D. F. F. M.; DA SILVA, M. S.; PIMENTA, M. B. F.; DA SILVEIRA E SÁ, R. D. Evaluation of the Toxicity of *Pradosia huberi* Extract during the Preimplantation in Wistar Rats. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1-6, 2013.
- 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 Medicinais**, 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.
- ROMAN, S. S.; DAMBROS, A.; ROSSET, A.; PISTORE, M.; SCHIMID, A. R.; CANSIAN, R. L. Toxicidade materna e reprodutiva de extrato hidroalcoólico de *Sonchus oleraceus* L. em ratos wistar. **Perspectiva**. v. 38, n.141, p. 69-77, 2014.

ROOS, M.H.; PAWLINA W. **Histologia – texto atlas**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.798-820, 2012.

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.

SÁ, R. D. C. D. S.; LEITE, M. N.; OLIVEIRA, L. E.; TOLEDO, M. M.; GREGGIO, T. C.; GUERRA, M. O. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male Wistar rats organs and reproductive system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 324-332, 2006.

SÁ, R. C. S.; OLIVEIRA, L. E. G.; FONSECA, D. V.; Bhattacharyya, J.; Salvadori, M. G. S., Almeida, R. N. Central nervous system effects of *Dioclea grandiflora* pods on mice. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.**, v. 12, n. 5, p. 446-456, 2013.

SÁ, R. D. C. D. S.; VIREQUE, A. A.; REIS, J. E. D. P.; GUERRA, M. D. O. Toxic effect of *Solanum Lycocarpum* in the male Wistar rats and swiss mice reproductive organs. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 19, p. 33-40, 2000.

SÁ, R. C. S.; VIREQUE, A. A.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O. Evaluation of the toxicity of *Solanum lycocarpum* in the reproductive system of male mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 283-287, 2000.

SACHETTI, C. G. **Avaliação toxicológica do óleo-resina de copaíba em ratos: estudos de toxicidade aguda, neurotoxicidade e embriofetotoxicidade**. 2010. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

SAENPHET, K.; JITJAINGAM, A.; CHAIYAPO, M. Reproductive Toxicity Test of Plant-Derived Insecticide in Male Rats. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 42, n. 4, p. 816-821, 2015.

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

SALUNKE, K. R.; AHMED, R. N.; MARIGOUDAR, S. R. Effect of graded doses of *Caesalpinia bonducella* seed extract on ovary and uterus in albino rats. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 22, n. 1-2, p. 49-53, 2011.

SANTOS, E. C. S. **Avaliação do potencial tóxico do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke sobre o sistema reprodutor masculino e órgãos vitais de ratos e sua prole**. 2012. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SANTOS, E. C. S.; ANTUNES, P. S.; DOS SANTOS, F. L. P.; ROCHA, A. D. O. B.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; MACÊDO, C. L.; JACOB, K. C.; OLIVEIRA, N. A.; MEDEIROS, A. A. N.; DINIZ, M. D. F. F. M.; SÁ, R. D. C. S. Assessment of *Pradosia huberi* effects on the reproductive system of male rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 0, p. 1-8, 2016.

SANTOS, M. C. **Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato de *Cordia ecalyculata* Vell: em ratos Wistar**. 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências. Universidade Estadual Paulista. Assis.

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.

SCHAUER, I. G.; ROWLEY, D. R. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. **Differentiation**, v. 82, n. 4, p. 200-210, 2011.

SCHLATT, S.; EHMCKE, J. Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 29, p. 2-16, 2014.

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.

SILBERSTEIN, S. D.; MERRIAM, G. R. Physiology of the menstrual cycle. **Cephalalgia**, v. 20, n. 3, p. 148-154, 2000.

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.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc51/03avaliacaocapacidade.html>>. [Acesso em 9 de Outubro de 2015].

SILVA, C. R. **Efeito do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar**. 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia. Universidade Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, M. C. F. **Reprodução humana e manipulação da fertilidade**. 2012. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia e Geologia. Universidade do Minho, Braga.

SILVA, P. V. **Avaliação do desenvolvimento do sistema genital e da função reprodutiva da prole feminina de ratos Wistar expostos à cisplatina durante a peri-puberdade**. 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

SILVA, S. A. S.; CASTRO, J. C. M.; SILVA, T. G., CUNHA, E. V. L., BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Kramentosan, a new trinorlignan from the roots of *Krameria tomentosa*. **Natural Product Letters**, v. 15, n. 5, p. 323-329, 2001.

SILVA, T. G. **Isolamento e elucidação estrutural de alguns constituintes de *Krameria tomentosa* A. St. Hill**. 1999. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa.

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.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5ª Ed. São Paulo: Artmed, 2009.

- SIMPSON, B. B. The Past and Present Uses of Rhatany (*Krameria*, *Krameriaceae*), 1991. **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 397-409, 1991.
- SIMPSON, B. B. *Krameriaceae*. Flora Neotropica Monograph, **The New York Botanical Garden**, v. 49, n. p. 1-109, 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: SIPIES, G.; MCQUEEN, C. A.; GANDOLFI, A. J. (Eds.). **Comprehensive Toxicology**. Cambridge: Cambridge university Press, 1997, p. 87-98.
- SOUTO MAIOR, F. N.; SIQUEIRA, J. S.; BARBOSA, M. D. S.; ALMEIDA, R. N. Desenvolvimento pós-natal da prole exposta ao extrato hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante o período gestacional de ratas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 22, n.4, p. 321-325, 2003.
- 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.
- STEDILE, R.; HOLLENBACH, C. B.; DE MELLO, F. B.; DA SILVA MELLO, F. P.; BING, R. S.; DA ROSA, P. P.; DE MELLO, J. R. B. Toxicidade reprodutiva da associação de itraconazol e beta-glucana em ratas e sua progênie. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1331, 2015.
- 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.
- SUTER, L.; CLEMMANN, N.; KOCH, E.; BECHTER, R. New and traditional approaches for the assessment of testicular toxicity. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 39-47, 1998.
- SWAMY, A. V.; PATEL, U. M.; KOTI, B. C.; GADAD, P. C.; PATEL, N. L.; THIPPESWAMY, A. H. M. Cardioprotective effect of *Saraca indica* against cyclophosphamide induced cardiotoxicity in rats: A biochemical, electrocardiographic and histopathological study. **Indian journal of pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 44, 2013.
- 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.

TERRA JUNIOR, O. N.; MALDONADO, J. V.; ARNÓBIO, A. Estudo do Desempenho Comercial dos Insumos Farmacêuticos Vegetais sob a Ótica do Comércio Exterior. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 3, 2015.

TERRES, L. F. Homogenização da coorte folicular pela administração de estradiol em ciclos de estimulação ovariana controlada com antagonista de GnRH (protocolo de doses múltiplas). 2005. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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.

TIWARI, D.; VANAGE, G. Mutagenic effect of bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. **Reproductive Toxicology**, v. 40, p. 60-68, 2013.

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.

TOU, J. C. L.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 11, p. 1861-1868, 1998.

TROINA, A. A. **Consumo materno da semente da linhaça (*Linum usitatissimum*) durante a lactação sobre o estado nutricional e ciclo reprodutivo da prole fêmea na idade adulta**. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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, n. 2, p. 189-306, 2006.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996. EPA/630/R-96/009-Guidelines for Reproductive Toxicity Risk. [PDF]. Disponível em: <<http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/REPRO51.PDF>>. [Acesso em 20 de setembro de 2014].

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001. FDA-2001. Reviewer Guidance. Integration of study results to assess concerns about human reproductive and developmental toxicities. [PDF]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/992079gd.pdf>>. [Acesso em 19 de setembro de 2015].

VALENTI, D.; LA VIGNERA, S.; CONDORELLI, R. A.; RAGO, R.; BARONE, N.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Follicle-stimulating hormone treatment in normogonadotropic infertile men. **Nature Reviews Urology**, v. 10, n. 1, p. 55-62, 2013.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Human Physiology: the mechanisms of body function**, 8ª ed. McGraw Hill, 2002.

VANZELER, M.; BARROS, W.; NASELLO, A.; LOPES, L. Ensaios preliminares em ratas Wistar com extrato hidroetanólico de calunga (*Simaba ferruginea* St. Hil.) vo, nas fases gestacionais de implantação, organogênese e período fetal: interferências na prole. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 3, p. 454-461, 2015.

VAZQUEZ-MARTINEZ, R.; LECLERC, G. M.; WIEMAN, M. E.; BOOKFOR, F. R.; Episodic activation of the rat GnRH promoter: role the homeoprotein oct-1. **Molecule Endocrinology**, v. 16, N.9, p. 2093-2100, 2002.

VIEIRA, J. E. V.; MATOS, F. J. A.; BARROS, G. S. G.; SOUZA, M. P.; MEDEIROS, M. C.; MEDEIROS, M. J. Abordagem farmacológica de plantas do Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.0, n. 2, p. 67-75, 1968.

VILELA, M. G.; DOS SANTOS JÚNIOR, J. L. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, p. 2007.

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

WALKER JUNIOR, W. F.; HOMBERGER, D. G. Urogenital system. In: **Anatomy & dissection of the rat**. 3.ed. Inglaterra: W.H. Freeman And Company, 1997, p. 65-78.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, T. S. **Fisiologia Humana, Os Mecanismos das Funções Corporais**, 9ª ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006, p. 617-663.

WINKLER, K.; WETZKA, B.; HOFFMANN, M. M.; FRIEDRICH, I.; KINNER, M.; BAUMSTARK, M. W.; ZAHRADNIK, H. P. Low density lipoprotein (LDL) subfractions during pregnancy: accumulation of buoyant LDL with advancing gestation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 12, p. 4543-4550, 2000.

WRIGHT W. W.; FRANKEL A. I. Endogenous androgen concentrations in nuclei isolated from seminiferous tubules of mature rat testes. **Journal of steroid biochemistry**, v. 10, n.6, 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CAMPUS I – JOÃO PESSOA - PB

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIDÃO

João Pessoa, 01 de março de 2012

CEPA Nº 0711/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Orientando(a) : Elane Cristina Silva dos Santos

Departamento/Setor: CBiotec

Ref.: **INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO ETANÓLICO E DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE *Krameria tomentosa* A. St. HILL. SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E FEMININO E ÓRGÃOS VITAIS DE RATOS E SUAS PROLES..**

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 144 ratos e 492 ratas..

Período: Até 06/2016.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do CBiotec/UFPB

ANEXO B

Fluxograma de realização do teste de toxicidade oral aguda com uma dose inicial de 300 mg/kg.

