

FABIANA FELIX DE OLIVEIRA

EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE *Phyllanthus niruri* LINN.
(QUEBRA-PEDRA) SOBRE O TESTÍCULO, PRÓSTATA, FÍGADO E RINS DE
RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA,
HISTOMORFOMÉTRICA E HORMONAL

Recife
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA

FABIANA FELIX DE OLIVEIRA

EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE *Phyllanthus niruri* LINN.
(QUEBRA-PEDRA) SOBRE O TESTÍCULO, PRÓSTATA, FÍGADO E RINS DE
RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA,
HISTOMORFOMÉTRICA E HORMONAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bióciência Animal, Área de Concentração em
Morfofisiologia Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do
grau de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Recife
2016

Ficha catalográfica

O48e Oliveira, Fabiana Felix de

Efeito dos extratos aquoso e etanólico de *Phyllanthus niruri* Linn. (Quebra-pedra) sobre o testículo, próstata, fígado e rins de ratos wistar adultos: avaliação histopatológica, histomorfométrica e hormonal / Fabiana Felix de Oliveira. – Recife, 2016.

94 f. : il.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Tese (Doutorado em Biociência Animal) –

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.

Referências.

1. Plantas Medicinais
 2. Quebra-pedra
 3. Morfometria testicular
 4. Próstata
 5. Rato
- I. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, orientador
II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA

FABIANA FELIX DE OLIVEIRA

EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE *Phyllanthus niruri* LINN.
(QUEBRA-PEDRA) SOBRE O TESTÍCULO, PRÓSTATA, FÍGADO E RINS DE
RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA,
HISTOMORFOMÉTRICA E HORMONAL

Aprovada em: 25/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Orientador)
Departamento de Medicina Veterinária – DMV/UFRPE

Prof^o Dr. Frederico Celso Lyra Maia
Departamento de Medicina Veterinária – DMV/UFRPE

Prof^a Carina Scanoni Maia
Departamento de Histologia – UFPE

Prof^a Dr. Ana Paula Castor Batista
PNPD – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof^a. Dr. Márcia de Figueiredo Pereira
Departamento de Medicina Veterinária – DMV/UFRPE

Dedico este trabalho a Deus...

... e àqueles que me ensinaram a não desistir dos meus sonhos, minha amada vó *in memória* Josefa Francisca, a minha mãe Josefa Maria e ao meu tio incentivador José Henrique.

“Tudo posso Naquele que me fortalece!”
Filipenses 4.13

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade de estudar e construir um futuro melhor.

A minha mãe Josefa Maria e ao meu tio José Henrique que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis ao longo dessa etapa.

Ao professor Valdemiro Junior que me acolheu de forma inusitada, mas que deu todo subsídio e apoio que precisei para desenvolver minha pesquisa. Obrigada pela confiança, por acreditar no meu potencial e pela oportunidade de trabalhar com uma ótima equipe, momentos especiais cuja lembrança levarei comigo para sempre. Muito obrigada!

Ao professor Frederico Maia por sua disponibilidade para ouvir, aconselhar, ler lâminas, muito obrigada.

A professora Tânia Sarmiento, que disponibilizou equipamentos fundamentais a execução deste trabalho.

A Telma Guedes do laboratório Biofito pelo treinamento nos equipamentos que precisei ao longo dessa trajetória, estreitando os laços para uma amizade. Muito obrigada!

A Leidiana Lima e Luciana Oliveira que me ensinaram e ajudaram nos momentos iniciais da identificação e coleta da planta. Obrigada meninas.

A Daniel Nunes por auxiliar na pesquisa. Obrigada.

Aos amigos do grupo Armaria Nan que encheram meu dia-a-dia de alegria e aprendizado, mais que amigos de Laboratório, amigos da vida, Alluanam Adelson, Anna Kelly, Ana Katharyne e Jessica Santana. Obrigada!

A Ana Katharyne que me incentivou e apresentou o professor Valdemiro Junior num momento crucial da minha trajetória acadêmica. Muito obrigada!

Aos queridos amigos Simone Macedo, Sandra Torres, Luiz André, Viniccius, Ebla, Jacilene e Victor Hugo que contribuíram com a pesquisa e com boas risadas durante o tempo de trabalho.

Aos alunos de Pibics Alberes Rafael e Yanik que contribuíram na parte prática do experimento.

Aos muitos amigos que aqui encontrei desde a graduação até este momento, de vários laboratórios. Foram 12 anos, lindos anos de muito aprendizado e conquistas, entrei uma adolescente e sai uma profissional.

Ao meu marido Clebson Barbosa pelo apoio e incentivo em todos os momentos, principalmente quando as coisas não estavam muito bem.

Aos animais que cederam suas vidas em prol da ciência. Obrigada!

A Renata e André do biotério do DMFA/UFRPE por cuidarem dos animais. Obrigada!

A Capes, pela concessão da bolsa.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RESUMO

Phyllanthus niruri L., conhecido como quebra-pedra, é uma erva daninha que ocorre amplamente nas regiões tropicais e podem ser encontradas em todos os estados brasileiros. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos extratos aquoso e etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre os testículos, próstata, fígado e rins de ratos Wistar adultos através de avaliação histopatológica, histomorfométrica e hormonal. Para a realização desse estudo foram utilizados 37 ratos machos que receberam extrato aquoso e etanólico de *Phyllanthus niruri* na proporção de 100mg/kg e 500mg/kg por 30 dias. As plantas inteiras foram secas em estufa a 50 °C, trituradas, pesadas. Para o extrato aquoso 5g do pó foi adicionado a 50 mL de água destilada, em ebulição por 10 minutos, filtrado, liofilizado, e armazenado até o uso a – 20° C. O extrato etanólico foi realizado na proporção de 2:1 de etanol, filtrados, rotaevaporados, e armazenado até o uso a – 20° C. Os extratos foram aplicados por meio de gavagem aos animais entre 100-140 dias de idade. Após 30 dias os animais foram eutanasiados com cetamina 115 mg/kg associada a xilazina 10mg/ml. Os órgãos foram removidos para análise toxicológica, morfométrica e histopatológica. Foram visualizadas poucas alterações no fígado e rins no extrato aquoso e alterações mais evidentes nesses mesmos órgãos quando utilizado o extrato etanólico, mas essas alterações não foram incompatíveis com a vida dos animais. O extrato aquoso não causou alterações no peso corporal, testicular, prostático ou de fígado e rim. Os níveis de testosterona aumentaram nos animais que receberam extrato aquoso, o número da população de células de Leydig aumentaram significativamente confirmando os achados do nível hormonal. A análise da próstata mostrou que o órgão sofreu aumento na altura do epitélio e volume do lúmen, epitélio e estroma, mas não de forma significativa. O extrato etanólico de *P. niruri* reduziu o peso corporal, testicular e dos rins, próstata, glândula vesicular e fígado não sofreram redução. Os níveis de testosterona aumentaram, o diâmetro nuclear das células de Leydig diminuíram porém a população de células de Leydig mantiveram-se. A análise da próstata mostrou que o órgão sofreu redução na altura do epitélio, volume do epitélio e estroma, e manteve-se no volume do lúmen mas não de forma significativa. O extrato aquoso mostrou-se menos tóxico em relação ao extrato etanólico.

Palavras-chave: Plantas Mediciniais. Quebra-pedra. Morfometria Testicular. Próstata.

ABSTRACT

Phyllanthus niruri L., known as stone breaker, is a weed that occurs widely in tropical regions and can be found in all Brazilian states. The aim of this study was to evaluate the effect of aqueous and ethanolic extracts of *Phyllanthus niruri* on the testis, prostate, liver and kidney in adult Wistar rats through histopathological, histomorphometric and hormonal evaluation. For this, aqueous and ethanolic extract of *Phyllanthus niruri* (100 mg/kg or 500 mg/kg) were given to 37 male rats for 30 days. The whole plants were dried at 50 °C, crushed and weighed. To the aqueous extract, 5 g of the powder was added to 50 mL of distilled water, boiling for 10 minutes, filtered, lyophilized, and stored at -20 °C. To the ethanolic extract, it was used the 2:1 ratio of ethanol. The extract was filtered, rotoevaporated and stored at -20 °C. Both extracts were administered by gavage to animals at 100-140 days old for 30 days. After this, the animals were anaesthetized with ketamine (115 mg/kg) and xylazine (10mg/ml) and euthanized. The organs were removed for toxicological, morphometric and histopathologic analysis. For the aqueous extract, it was observed few alterations in the liver and kidneys. The ethanolic extract caused more severe damage to these organs, however, these changes are not incompatible with life. The aqueous extract did not changed the weight of the body, testis, prostate, liver and kidney, however, it increased serum testosterone levels and Leydig cells population. In addition, prostate epithelial height and volume (lumen, epithelium and stroma) also increased, but not significantly. The ethanolic extract reduced the weight of the body, testis and kidney. Prostate, seminal vesicles and liver weight did not change. Serum testosterone levels increased, nuclear diameter of Leydig cells decreased, but the population of these cells did not change. In prostate, epithelium height and volume and stroma volume decreased. The aqueous extract showed lower toxicity than the ethanolic extract.

Key-words: Medicinal Plants. Stone Breaker. Testicular Morphometry. Prostate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia de <i>Phyllanthus niruri</i> e Exsicata da planta.	24
Figura 2	Desenho esquemático da estrutura química da testosterona e diidrotestosterona.	27
Figura 1	A- Peso corporal (g) B- Peso testicular (g) e C- Índice gonadossomático – IGS (%) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	45
Figura 2	A- Peso de Próstata (g) B- Glândula seminal (g) e C- Epidídimo (g) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	46
Figura 3	A- Volume tubular (mL) e B- Volume ocupado pelo interstício (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	47
Figura 4	Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero de testículo de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	48
Figura 5	A- Comprimento total do túbulo (m) B- População de células de Sertoli (10^7) C- Produção espermática diária (PDE) por testículo (10^6) e Produção espermática diária (PDE) por (g) de testículo (10^6) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	49
Figura 6	A- Níveis séricos de testosterona B- Diâmetro nuclear de Leydig (μm) C- Volume de Leydig (μm^3) e D- População de células de Leydig (10^6) por testículo em ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	51
Figura 7	Fotomicrografia comparando o compartimento tubular no estágio 7 da espermatogênese e o compartimento intersticial em ratos do grupo controle (A-B) 100mg/kg de <i>P. niruri</i> (C-D), e 500 mg/kg de <i>P. niruri</i> (E-F) L- lúmen Epi – Epitélio Int – Interstício VS – vaso sanguíneo; seta preta indica células de sertoli Seta branca indica célula de sertoli. Aumento 400x e 1000x.	52
Figura 8	Fotomicrografia do fígado de ratos do grupo controle (A-B) 100mg/kg de <i>P. niruri</i> (C-D) e 500 mg/kg de <i>P. niruri</i> (E-F). Asterísco indica dilatação dos capilares sinusóides, Estrela indica necrose de coagulação, Seta preta indica vacuolização, Cabeça de seta indica hepatócitos binucleados. Aumento de 100x e 400x.	54

Figura 9	Fotomicrografia rim de ratos do grupo controle (A-B), 100mg/kg de <i>P. niruri</i> (C-D), e 500 mg/kg de <i>P. niruri</i> (E-F). Seta preta indica atrofia glomerular; Estrela indica glomerulonefrite proliferativa. Aumento de 100x e 400x.	55
Figura 10	A- Altura do epitélio prostático (μ) B- Volume do Epitélio Prostático (mL) C- Volume do Estroma Prostático (mL) C- Volume do Lúmen Prostático (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	57
Figura 11	Fotomicrografia da próstata. A e B animais controle C e D animais tratados com 100mg/kg, evidenciando o Lúmen, Epitélio e Estroma prostático; E e F, animais tratado com 500mg/kg de extrato aquoso de <i>P. niruri</i> . Estrela indica região do estroma, cabeça da seta o epitélio prostático, o asterisco indica o lúmen.	58
Figura 1	A- Peso Corporal (g), B- Testicular (g) e C- Índice Gonadossomático – IGS (%), D- Epidídimo (g), E- Próstata (g), F- Glândula Seminal (g) de ratos adultos tratados com extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> nas concentrações de 100 mg/kg e 500 mg/kg.	76
Figura 2	A- Peso Hepático e B Peso Renal de ratos adultos tratados com extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	77
Figura 3	A- Volume tubular (mL) e B- Volume ocupado pelo interstício (mL) de ratos adultos tratados com extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	77
Figura 4	Diâmetro Tubular e Altura do Epitélio Seminífero de testículo de ratos adultos tratados com extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	79
Figura 5	A- Comprimento Total do Túbulo (m), B- População de Células de Sertoli (10^7), C- Produção Espermática Diária (PDE) por testículo (10^6) e Produção Espermática Diária (PDE) por (g) de testículo (10^6) de ratos adultos tratados com extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	80
Figura 6	A- Diâmetro Nuclear de Leydig (μm). B- Volume de Leydig (μm ³) C- População de Células de Leydig por testículo (10^6) e D- Níveis Séricos de Testosterona em ratos adultos tratados com extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	81
Figura 7	Fotomicrografia comparando o compartimento tubular no estágio 7 da espermatogênese e o compartimento intersticial em ratos do grupo controle (A-B), 100mg/kg de <i>P. niruri</i> (C-D), e 500 mg/kg de	83

P. niruri (E-F). L- lúmen; Epi – Epitélio; Int – Interstício; VS – vaso sanguíneo; seta preta indica células de sertoli; Seta branca indica célula de sertoli. Aumento 400x e 1000x.

- Figura 8 Fotomicrografia do fígado de ratos do grupo Controle (A-B). 100mg/kg de *P. niruri* (C-D), e 500 mg/kg de *P. niruri* (E-F). Asterísco indica dilatação dos capilares sinusóides, seta azul indica estreitamento dos capilares sinusóides, Seta vermelha indica congestão, Cabeça de seta preta indica hepatócito binucleado ou grande. Aumento de 100x em A, C e E e 400x em B, D e F. 85
- Figura 9 Fotomicrografia rim de ratos do grupo controle (A-B), 100mg/kg de *P. niruri* (C-D), e 500 mg/kg de *P. niruri* (E-F). Seta vermelha indica atrofia glomerular. Seta preta indica Glomerulonefrite proliferativa. Cabeça de seta preta indica congestão. Aumento de 100x em A, C e E e 400x em B, D, e F. 86
- Figura 10 Fotomicrografia da próstata, A e B animais controle; C e D animais tratados com 100mg/kg, evidenciando o lúmen, epitélio e estroma prostático; E e F, animais tratado com 500mg/kg de extrato etanólico de *P. niruri*. Es - região do estroma, Ep - epitélio prostático, L - indica o lúmen. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros biométricos de ratos Wistar adultos do grupo controle e tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	46
Tabela 2	Volume Tubular (mL) e volume intersticial (mL) do túbulo seminífero dos animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> .	47
Tabela 3	Diâmetro Tubular, Altura do epitélio seminífero, Comprimento total do túbulo seminífero (m), População de células de Sertoli ($\times 10^6$), Produção espermática diária/ testículo ($\times 10^6$) e Produção espermática diária por grama de testículo dos animais dos grupos controle e tratados com aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> nas dosagens de 100 e 500 mg/kg de animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> .	48
Tabela 4	Níveis de testosterona plasmática (nMol/L), Diâmetro nuclear de células de Leydig (μm), Volume individual de célula de Leydig (μm^3) e População de células de Leydig dos animais dos grupos controle e tratados com 100 e 500 mg/kg de extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> .	51
Tabela 5	Achados histopatológicos em fígado e rim de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato aquoso <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	54
Tabela 6	Achados histopatológicos em fígado e rim de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato etanólico <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	56
Tabela 7	Altura do epitélio prostático (μm), Volume do Epitélio Prostático (mL), Volume do Estroma Prostático (mL), Volume do Lúmen Prostático (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	56
Tabela 1	Parâmetros biométricos de ratos Wistar adultos do grupo controle e tratados com extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	76
Tabela 2	Volume Tubular (mL) e volume intersticial (mL) do túbulo seminífero dos animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .	78
Tabela 3	Diâmetro Tubular e Altura do Epitélio Seminífero de animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do Extrato Etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .	79

Tabela 4	Níveis de testosterona plasmática (nMol/L), Diâmetro nuclear de células de Leydig (μm), Volume individual de célula de Leydig (μm^3) e População de células de Leydig dos animais dos grupos controle e tratados com 100 e 500 mg/kg de extrato etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .	81
Tabela 5	Achados histopatológicos em fígado de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato etanólico <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	84
Tabela 6	Achados histopatológicos em rins de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato etanólico <i>Phyllanthus niruri</i> nas doses de 100 e 500 mg/kg.	84
Tabela 7	Altura do epitélio prostático (μm), Volume do Epitélio Prostático (mL), Volume do Estroma Prostático (mL), Volume do Lúmen Prostático (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i> em diferentes concentrações.	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CT	Comprimento Total
DM	Diâmetro Médio
EA	Extrato Aquoso
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Grama
IGS	Índice Gonadossomático
Kg	Quilograma
LH	Hormônio Luteinizante
mL	Mililitro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
<i>P. niruri</i>	<i>Phyllanthus niruri</i>
PED	Produção Espermática Diária
UI	Unidades Internacionais
VATS	Volume Absoluto ocupado pelos Túbulos Seminíferos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	21
2.2	<i>Phyllanthus niruri</i>	22
2.2.1	MORFOLOGIA DA PLANTA	23
2.2.2	IMPORTÂNCIA NO CENÁRIO ATUAL	24
2.2.3	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO <i>Phyllanthus niruri</i>	25
2.3	PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	25
3	TESTÍCULOS	26
3.1	ESPERMATOGÊNESE	28
3.2	PRÓSTATA	28
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL	31
4.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
	REFERÊNCIAS	32
	CAPÍTULO I	
	Artigo - EFEITO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Phyllanthus niruri</i> L. SOBRE O TESTÍCULO, PRÓSTATA, FÍGADO E RINS EM RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HISTOMORFOMÉTRICA E HORMONAL	36
1	INTRODUÇÃO	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	IDENTIFICAÇÃO TAXONOMICA DO <i>Phyllanthus niruri</i>	39
2.2	PROCESSAMENTO DO <i>Phyllanthus niruri</i>	39
2.3	MODELO ANIMAL	40
2.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	40

2.5	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE	40
2.6	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	41
2.7	ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO	41
2.8	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DOS TESTICULOS	41
2.9	PROCESSAMENTO DE MATERIAL PARA HISTOPATOLOGIA	43
2.9.1	TESTOSTERONA SÉRICA	43
3	MORFOMETRIA PROSTÁTICA	44
3.1	PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DA PRÓSTATA	44
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS	45
5.1	ANÁLISE DO PESO, CORPORAL, EPIDÍDIMO, PRÓSTATA, VESÍCULA, TESTÍCULOS E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS)	45
5.2	RELAÇÃO VOLUME DO TÚBULO SEMINÍFERO (ML) X VOLUME DO INTERSTÍCIO (ML)	47
5.3	COMPARTIMENTO TUBULAR	48
5.4	COMPARTIMENTO INTERSTICIAL (TESTOSTERONA E CÉLULAS DE LEYDIG)	50
5.5	MORFOMETRIA PROSTÁTICA	53
5.6	PESO DO FÍGADO E RINS	56
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO II	
	Artigo - EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Phyllanthus niruri</i> L. (QUEBRA-PEDRA) SOBRE OS TESTICULOS, PROSTÁTA, RINS E FÍGADO EM RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HISTOMORFOMÉTRICA E HORMONAL	66
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1	IDENTIFICAÇÃO TAXONOMICA DO <i>Phyllanthus niruri</i>	69

2.2	PROCESSAMENTO DO <i>Phyllanthus niruri</i>	69
2.3	MODELO ANIMAL	70
2.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	70
2.5	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE	70
2.6	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	71
2.7	ÍNDICE GONODASSOMÁTICO	71
2.8	AVALIAÇÃO QUALITATIVA, QUANTITATIVA E HISTOPATOLÓGICA TESTICULAR	71
2.9	PROCESSAMENTO DE MATERIAL PARA HISTOPATOLOGIA	73
2.9.1	TESTOSTERONA SÉRICA	74
3	MORFOMETRIA PROSTÁTICA	74
3.1	PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DA PRÓSTATA	74
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
5	RESULTADOS	75
5.1	ANÁLISE DO PESO, CORPORAL, EPIDÍDIMO, PRÓSTATA, VESÍCULA, TESTÍCULOS, ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS), FÍGADO E RINS	75
5.2	RELAÇÃO VOLUME DO TÚBULO SEMINÍFERO (ML) X VOLUME DO ÍNTERSTÍCIO (ML)	77
5.3	COMPARTIMENTO TUBULAR	78
5.4	COMPARTIMENTO INTERSTICIAL (TESTOSTERONA E CÉLULAS DE LEYDIG)	80
5.5	PESO DO FÍGADO E RINS	87
5.6	MORFOMETRIA PROSTÁTICA	88
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais, sempre foram um dos recursos mais utilizados no tratamento de várias doenças que acometem o corpo humano desde a antiguidade (MARQUES, 1997). O conhecimento e utilização de plantas para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal, apesar de algumas plantas conterem substâncias que exercem efeitos adversos. Assim podem apresentar ação terapêutica ou tóxica (MACIEL, et al. 2002; GOMES, et al. 2002; MORGAN, 2003; ARNOUS et al. 2005; VEIGA JUNIOR, et al. 2005).

O Brasil é o país que apresenta uma das maiores biodiversidades no mundo (CALIXTO, 2003), possuindo uma imensa quantidade de plantas com fins medicinais, dentre elas estão quebra-pedra, camomila, espinheira santa e erva-doce, que possuem importantes atividades farmacológicas, tanto em suas partes como no todo e, por assim se apresentarem são muito comercializadas.

A partir do conhecimento dos benefícios causados pela ingestão de plantas medicinais foram criados no Brasil programas para estudo das atividades químicas dessas plantas, tal como o Programa Farmácia Viva, criado pelo professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, há mais de 30 anos. Foi o primeiro programa de assistência social farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais desenvolvido no Brasil com objetivo de produzir medicamentos fitoterápicos, acessíveis à população carente (MATOS, 1994). Posteriormente, a sua criação, tornou-se referência para o Nordeste brasileiro e, em seguida, para todo o país (MALTA et al. 1999).

O *Phyllanthus niruri* L., conhecido como quebra-pedra, é uma erva daninha que ocorre amplamente nas regiões tropicais (CALIXTO et al. 1997; LORENZI & MATOS, 2002), e desenvolve-se em qualquer tipo de solo e podem ser encontradas em todos os estados brasileiros (LORENZI & MATOS, 2002). Essa espécie é popularmente utilizada para doenças que acometem os rins, como o tratamento de cálculo renal e urinário, e também diabetes (CALIXTO, et al. 1997). O teste realizado por Syamasundar et al. (1985) revelaram também a presença de constituintes com ação antihepatotóxicas em extratos de *Phyllanthus niruri* L.

Estudos experimentais com as folhas e sementes têm demonstrado sua ação hipoglicemiante, antibacteriana e anticancerígena (MOUCO, et al. 2003).

Assim as plantas fitoterápicas ou medicinais são usadas amplamente inclusive como afrodisíacas, atuando como solução de problemas de disfunção erétil ou simplesmente para melhorar o desempenho sexual. Algumas plantas consideradas afrodisíacas também possuem outras atuações farmacológicas como a anticancerígena, antidiabética, hepatoprotetora, cardioprotetora e analgésica, mas com efeitos adversos para as funções reprodutivas masculinas, em animais e humanos, tais como, *Ocimum sanctum* (AHMED, 2002), *Sarcostemma acidum* (VENMA et al. 2002), *Azadirachta indica*, (ALADAKATTI e AHAMED, 2005), *Syzygium aromaticum*, (MISHRA e SINGH, 2008).

Os testículos são os órgãos responsáveis pela produção de espermatozoides e hormônios androgênicos atuando diretamente nas funções reprodutivas e nas características sexuais secundárias. Estão revestidos pela túnica albugínea e subdivididos no compartimento tubular e intersticial. O processo de espermatogênese ocorre no compartimento tubular com atuação das células de Sertoli e no compartimento intertubular ou intersticial ocorre à produção de testosterona através das células de Leydig (RUSSEL et. al., 1990).

O estudo qualitativo e quantitativo nos testículos e próstata permite observar a atuação das substâncias encontradas no extrato e fornecer respostas sobre a ação positiva ou negativa do extrato aquoso de *P. niruri* no processo espermatogênico, na produção espermática diária e no funcionamento das células de Leydig. A partir dessas informações houve a necessidade de aprofundar o conhecimento das propriedades de *P. niruri* e relacioná-las ao sistema reprodutor masculino através da avaliação histopatológica, histomorfométrica e toxicológica de fígado e rins de ratos Wistar adultos.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde a antiguidade as plantas medicinais são conhecidas por apresentarem uma fonte terapêutica valiosa e até os dias atuais muitos medicamentos são produzidos a partir de derivados de plantas ou produtos naturais (ATANASOV, et al. 2015; KINGHORN et al. 2011; NEWMAN e CRAGG, 2012).

Os primeiros estudos sobre a constituição química das plantas foram relatados a partir do século XVIII antes disso as plantas eram usadas apenas com base em conhecimento empírico de informações repassadas entre as pessoas (SNEADER, 2005; FRANCO, 2005).

Segundo Schenkel et al. (2002) as plantas medicinais podem ser conceituadas como vegetais que possuem fins terapêuticos, com base no conhecimento popular ou conhecimento científico. Medicamentos fitoterápicos, são constituídos exclusivamente por plantas, não havendo nenhuma mistura com componentes sintéticos (MARQUES, 1997).

O modo de utilização dessas plantas medicinais ou fitoterápicas na medicina popular assim como na científica é amplo, sendo encontradas e utilizadas geralmente como: - substâncias ativas isoladas; - extratos purificados ou selecionados, centrados em grupos de substâncias específicas; - extratos totais, padronizados em relação a uma substância ou a uma especificação determinada e como droga íntegra ou triturada destinada à preparação de infusões ou decocções aquosas (chás) (SCHENKEL et al., 2002). A diversidade de utilização dessas plantas gera uma necessidade maior de pesquisas para investigar a ação das mesmas sobre o propósito ao qual estão sendo testadas e sua toxicidade em órgãos vitais como rim e fígado.

2.2 *Phyllanthus niruri*

Phyllanthus niruri Linn. pertence à família *Phyllanthaceae*, gênero *Phyllanthus*, que contém mais de 600 espécies, , muitas das quais crescem no Brasil. Trata-se de uma planta bastante conhecida na medicina tradicional e é popularmente chamada de erva-pombinha (SIMÕES et al., 1986; GARLET, 2000), quebra-pedras-de-arvorezinha (GARLET, 2000), e quebra-pedra (SIMÕES et al., 1986; RITTER et al., 2002). Dos exemplares que compõem o gênero, apresentam-se sob a forma de arbustos, árvores e ervas. Espécies como *P. accuminatus*, *P. amarus*, *P. anisolobus*, *P. emblica*, *P. flexuosus*, *P. fraternes*, *P. pulcher*, *P. mullernus*, *P. niruri*, *P. niruroides*, *P. orbiculatus*, *P. oxyphyllus*, *P. raticulatus*, *P. simplex*, *P. urinaria*, *P. virgatus*, e *P. watsonii* foram investigadas em pesquisas fitoquímicas e farmacológicas (BAGALKOTKAR et al., 2006; EMBRAPA, 2006).

Dentre as espécies do gênero *Phyllanthus*, *P. niruri* (Figura 1-A) é nativa da Floresta Amazônica e de outras áreas tropicais do Brasil e do mundo, como Bahamas, sul da Índia, China, Gana, Nigéria, entre outros (SAMALI et al., 2012; BAGALKOTKAR et al., 2006). De todas as espécies que compõe esse gênero o *P. niruri* é a mais conhecida e estudada, é muito confundida com *P. amarus*, mas possuem pequenas diferenças descritas a seguir. Apesar de outras espécies que compõe o gênero serem chamadas de quebra-pedra, a única espécie que possui propriedades medicinais oficialmente comprovadas é *P. niruri* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)

Durante anos *P. niruri* e *P. amarus* foram usadas como sendo a mesma planta, mas apesar de sua semelhança, diferenciam-se pelas folhas assimétricas, inflorescências unissexuais e estiletos capitados em *P. niruri* e folhas simétricas, inflorescências bissexuais e estiletos agudos em *P. amarus*. Ambas são encontradas em regiões tropicais brasileiras facilmente.

Na literatura consultada foi verificado seu uso medicinal principalmente para infecções que acometem o rim ou a bexiga, suas folhas são utilizadas como diuréticas, litolíticas, eupépticas em afecções do fígado, icterícia, cólicas renais, moléstias da bexiga, retenção urinária e como auxiliar na eliminação do ácido úrico. As sementes, os frutos e as folhas são utilizados em pacientes diabéticos (SIMÕES et al. 1986).

Apresenta propriedades fitoquímicas e farmacológicas com mais de 50 compostos tais como alcaloides, lignanas, flavonoides e triterpenos. Além de rutina, beta-alanina, beta sistoterol, ácido caféico, geranina, quercitina, niruside, e ácido repanusidic, que atuam como constituinte importante na prevenção e inibição do crescimento de cálculos e mantém os cristais dispersos facilitando sua eliminação (BOIM, et al. 2010).

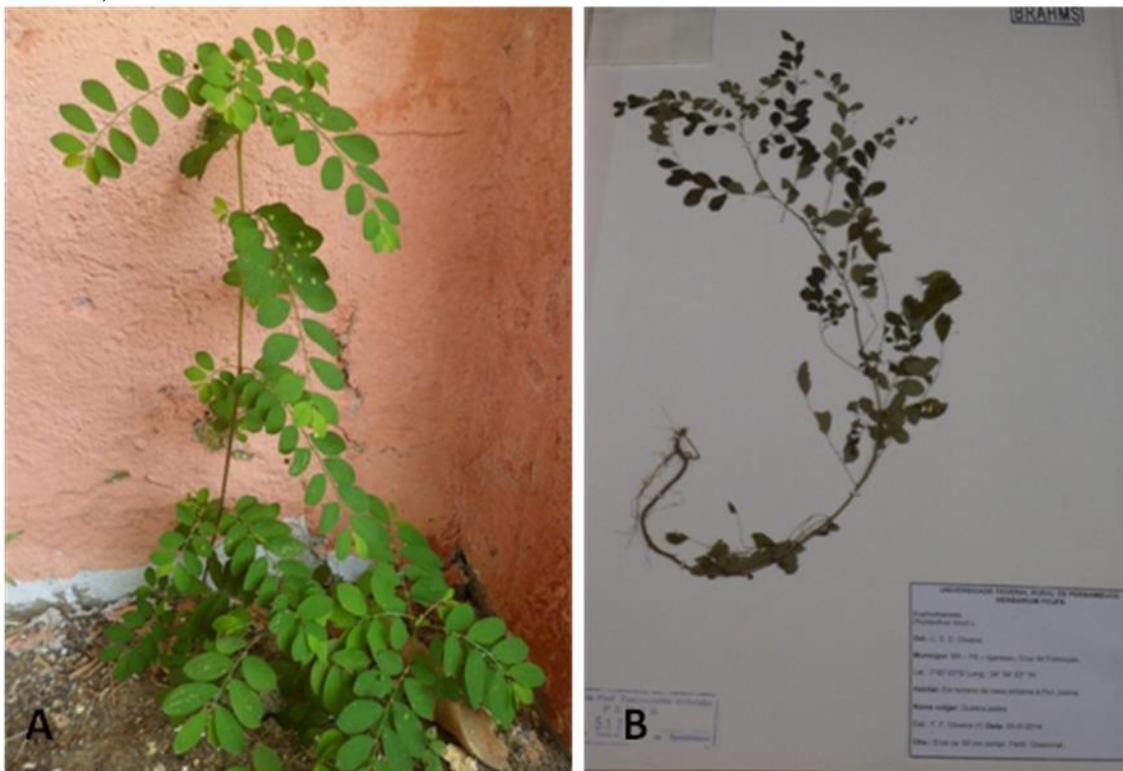
A partir dos componentes químicos encontrados muitos estudos têm sido realizados, para comprovar suas propriedades, algumas já conhecidas como a anti-hipertensiva, hepatoprotetora, analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana além de anti-carcinogênica (JOY e KUTTEN, 1998), anti-nociceptiva, hipoglicêmica, anti-oxidante, diurética, anti-inflamatória, tratamentos hepatotóxico e hepatite B (BAGALKOTKAR et al., 2006; MANJREKAR, 2008).

Muitos testes já foram realizados para descobrir os benefícios oriundos das partes e do todo da planta estudada, mas não foram encontrados na literatura disponível, muitos trabalhos envolvidos com patologias associadas ao sistema reprodutor masculino e a influencia da planta com os hormônios que atuam nesse sistema. Sendo assim, faz-se necessário desenvolver novos estudos e mecanismos através da fitoterapia para avaliar novos tratamentos e atividades desempenhadas por essas plantas, como a ação nos testículos, próstata, rins e fígado.

2.2.1 MORFOLOGIA DA PLANTA

P. niruri é espécie ruderal, encontrada florida e com frutos durante todo o ano. É uma erva pequena de haste ereta, fina e ramosa, medindo entre 12-40 cm, monóica, anual, glabra, as folhas da espécie são pequenas, ovais e alternadas. Apresenta flores amarelo-esverdeadas e frutos secos (SILVA e SALES, 2004).

Figura 1 A- Fotografia de *Phyllanthus niruri*. B- Fotografia da exsicata de *Phyllanthus niruri* L. registrada no herbário Vasconcelos Sobrinho da UFRPE. Fonte: Oliveira,2015.



2.2.2 IMPORTÂNCIA NO CENÁRIO ATUAL

O ministério da saúde criou uma relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS baseado em espécies já utilizadas em serviços de saúde estaduais e municipais de acordo com o conhecimento popular, químico e farmacológico das espécies inclusas. Essa seleção de plantas foi realizada por técnicos da Anvisa e do Ministério da Saúde de acordo com o Código Internacional de Doenças (CID-10) (MINISTERIO DA SAÚDE, 2009).

P. niruri está inclusa na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), (SUS), portanto, trata-se de uma espécie com potencial para tratamento de diversas patologias que poderão resultar em fitoterápicos que serão distribuídos por programas de saúde do governo (PHARMACIA BRASILEIRA, 2009).

O uso de *P. niruri* tanto no emprego da medicina popular quanto no estudo de suas propriedades químicas e farmacológicas, dá-se frequentemente pela planta inteira, no entanto, na Farmacopéia Brasileira sua monografia descreve as partes aéreas como a droga oficial e o ácido gálico como um de seus marcadores químicos (BRASIL, 2010b).

2.2.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO *Phyllanthus niruri*

Pesquisas fitoquímicas sobre os compostos de *Phyllanthus niruri* L., relatam a presença de lignanas, alcalóides, terpenos e taninos, que se destacam por possuírem princípios ativos que atuam com ação de hepatoproteção, ação antiinflamatória, inibição da enzima transcriptase reversa, ação contra hepatite e aumento da citotoxicidade da vimblastina contra células cancerígenas multirresistentes (MURUGAIYAH; CHAN, 2007). Couto, (2005) e Gilberto et al. (2005) acrescentam cumarinas, fenóis, flavanóides, lipídeos e triterpenos.

2.3 PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADES NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

Muitas são as espécies de plantas utilizadas com finalidades terapêuticas na medicina popular, por apresentarem princípios ativos para diversas patologias associadas a diferentes doenças inclusive as que atingem o sistema reprodutor masculino. Esses efeitos observados têm sido atribuídos a propriedades antiespermatogênicas ou antiesteroidogênicas de um ou mais compostos ativos (D'CRUZ et al., 2010).

Subeki (2005), Cimanga (2004) e Simons et al. (1995), descrevem que *P. niruri* possui atividade antifertilidade, pela presença de compostos como a quinina e cloroquina (MEISEL, 1993; ADEEKO e DAADA, 1998). Relatos semelhantes foram documentados a outras ervas como a *Azadirachta indica* (OZE, et al. 2007).

Ahmed et al. (2002) em pesquisa com o extrato benzênico das folhas de *Ocimum sanctum*, aplicadas em ratos com dosagem de 250 mg/kg durante 48 dias, demonstraram uma diminuição da quantidade espermática, motilidade e velocidade de deslocamento dos espermatozoides, sendo esses efeitos reversíveis após duas semanas da retirada do

tratamento. Vacúolos intraepiteliais em diferentes tamanhos foram encontrados no citoplasma das células de Sertoli quando aplicado extrato do pó da folha *Azadirachta indica* (ALADAKATTI e AHAMED, 2005).

3 TESTÍCULOS

Os testículos são órgãos com função endócrina e exócrina que produzem os espermatozoides, estão localizados dentro do escroto, envolvidos pela túnica albugínea. Abrigam células germinativas masculinas, produzem testosterona e outros hormônios que possuem um papel relevante na determinação dos caracteres sexuais secundários (OLIVEIRA, 2010; ESPERANÇA, 2010; MOORE, 2011). Estes são divididos funcionalmente em dois compartimentos, o tubular formado por túbulos seminíferos, local onde ocorre a espermatogênese e o compartimento intersticial ou intertubular que é composto pelas células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e outras células tais como fibroblastos, macrófagos e mastócitos (RUSSEL et al. 1990).

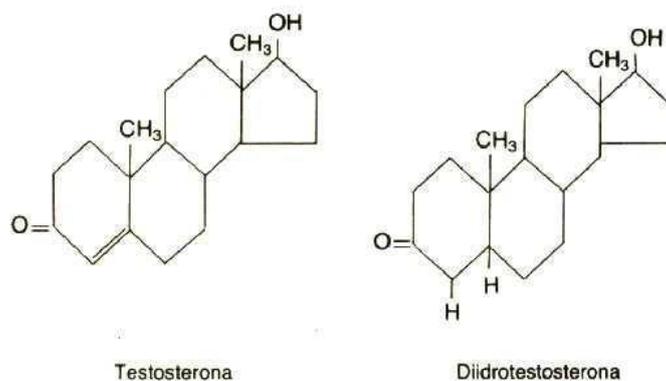
O compartimento tubular constitui a maior proporção dos testículos, ocupando de 70 a 90% do parênquima testicular na maior parte dos mamíferos. Esses túbulos formam alças contorcidas que possuem duas extremidades conectadas a rede testicular bastante vascularizada e de tecido conjuntivo, chamada mediastino testicular. Os túbulos seminíferos são constituídos por uma túnica própria externamente, o epitélio seminífero e lúmen do túbulo.

A túnica própria é formada por sua vez pela membrana basal e pelas células mióides, além de componentes acelulares como as fibras colágenas, no epitélio seminífero são visualizados as células germinativas e as células de Sertoli. Esta última divide o epitélio germinativo em dois compartimentos: um chamado basal onde encontra-se as espermatogônias e os espermátocitos primários, pré-leptótenos, leptótenos, ou seja, na fase inicial da prófase meiótica, e o outro chamado adluminal, onde encontram-se os espermátocitos a partir do zigóteno, os espermátocitos secundários e as espermátides. As células de Sertoli ocupam o epitélio desde a base até o ápice através de junções de oclusão proporcionando ao epitélio germinativo um ambiente imunoprivilegiado e isolado, sendo essencial para o processo da espermatogênese (RUSSEL et al. 1990; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na espermatogênese (MONSEES et al., 2000), pois possuem muitas funções e as desempenham simultaneamente, dando suporte ao epitélio, sustentação e manutenção das células germinativas, fagocitose e eliminação de debris celulares liberados pelas espermatídes alongadas durante a espermiogênese (RUSSELL et al. 1990; RUSSELL e GRISWOLD, 1993).

No compartimento denominado intersticial ou interbular do testículo encontram-se as células de Leydig, que atuam na produção dos hormônios esteróides, principalmente a testosterona (Figura 2) (KIM e YANG, 1999). Além das células de Leydig estão presentes também vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e outras células tais como fibroblastos, macrófagos e mastócitos. As células de Leydig são bem características devido à grande quantidade de gotículas de gordura e retículo endoplasmático liso apresentando caráter eosinófilico (ROSS et al. 2003) A produção de andrógenos pelas células de Leydig ocorre sob o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

Figura 2. Testosterona e dihidrotestosterona (Guyton, 2002).



3.1 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo sincrônico que atua na produção de milhões de espermatozóides por dia nos testículos. Trata-se de um evento complexo e sofisticado que envolve três fases principais, a mitótica ou espermatogonial, a meiótica ou spermatocitogênica e pós meiótica, de diferenciação ou espermiogênica. Outros eventos também envolvidos tais como a migração de células, diferenciação e apoptose que estão fortemente relacionadas a mecanismos moleculares que regulam as três principais fases (RUSSEL et al. 1990; SHIMA JE, et al. 2004; LAIHO A. et al. 2013).

O epitélio seminífero é organizado em etapas cíclicas, de modo que cada secção transversal conterá um número definido de células germinativas em um determinado momento de desenvolvimento. Nessa etapa as células se diferenciam até formarem espermatozóides funcionais. Essas células espermatogênicas encontram-se organizadas em associação distintas ou estádios de forma sucessiva e organizada (HERMO et al. 2010; KOTAJA, et al. 2004).

Essas associações podem ser classificadas de duas formas, pelo método de morfologia tubular ou pelo método do sistema acrossômico. Para o método de morfologia tubular são descritos oito estágios do ciclo a todas as espécies e no método do sistema acrossômico, o número de estádios variam de acordo com a espécie (FRANÇA e RUSSELL, 1998; RUSSELL et al. 1990).

Em mamíferos a duração varia de 30 a 75 dias, sendo no rato 58 dias. O sucesso da espermatogênese depende da ação sincronizada e do controle de duas principais atuações, a endócrina, a partir do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) da glândula pituitária e da relação intercelular, através dos efetores parácrinos como a testosterona, citocinas e fatores de crescimento ou ainda pelo contato direto entre as células adjacentes (FIORINI et al. 2004).

3.2 PRÓSTATA

É uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino que apresenta morfologia externa semelhante a uma “castanha”, é responsável por produzir o líquido prostático que é útil para a movimentação, nutrição e preservação dos espermatozóides.

Apresenta-se, circundando a uretra abaixo da vesícula urinária (MARIEB e HOEHN, 2009).

Segundo Simpson (1997), a próstata está subdividida em três zonas distintas, que representam proporções diferentes, sendo a região central com 25% do volume, a zona periférica com 70% - sendo este o local onde é mais propício ao desenvolvimento de câncer prostático – e a zona de transição que representa os 5% restantes do volume da próstata e onde é encontrado o desenvolvimento das hiperplasias prostáticas. Histologicamente é constituída por um conjunto de glândulas túbulo-alveolares, revestidas por um epitélio secretor simples (NIU e XIA, 2009). O estroma prostático é formado por tecido conjuntivo, fibras musculares, vasos sanguíneos, fibras nervosas e em sua periferia é constituída por uma delgada cápsula fibro-elástica que envolve a glândula e que nela penetra por meio de septos (DAHL et al. 1973, ZABETONI e TABOJA, 2001). A regulação e manutenção da atividade prostática são mantidas pela interação entre estroma-epitélio (LEE, 1996).

Em relação aos roedores, a glândula prostática está subdividida em três lobos pares e distintos, denominados lobos ventral, lateral e dorsal, isso em relação à uretra. Esses lobos possuem funções semelhantes a da próstata humana. A próstata é uma glândula hormônio dependente, a testosterona é o principal andrógeno a induzir sua diferenciação, acredita-se que a ação de outros hormônios como, por exemplo, a prolactina atue sinergicamente à testosterona, para regular as atividades dessa glândula (COSTELLO e FRANKLIN, 2000).

A Próstata ventral é a mais utilizada em pesquisas científicas, pois, este é o lobo mais semelhante à próstata humana no que se refere à influência dos androgênios sobre sua fisiologia e morfologia. Adicionalmente a este fato, outra característica é que a próstata ventral possui uma quantidade de dobras menor no epitélio em relação aos outros lobos.

O hormônio de maior atuação é a forma hidroxilada da testosterona, a diidrotestosterona DHT (Figura 2), devido à alta afinidade com os receptores de androgênio (RA). Vários outros hormônios como os estrogênios, os glicocorticoides, a prolactina e a insulina, também têm sido implicados no controle da próstata (CUNHA, et. al., 1987; VARGAS, 2013).

As células prostáticas sofrem influência de fatores intrínsecos por meio de mecanismos parácrinos, autócrinos e intracelulares que correspondem, em grande parte,

a diferentes tipos de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal, o de queratinócito, e o de fibroblastos. Dessa forma os andrógenos atuam com função diretamente relacionada ao crescimento prostático através dos receptores de andrógenos ou indireto pela secreção de fatores de crescimento, que estimulam atividades específicas nas células prostáticas como, por exemplo, a proliferação das células epiteliais e estromais (TABOJA et al. 2009).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar os efeitos do extrato aquoso e etanólico de *Phyllanthus niruri* L. sobre os testículos, próstata, fígado e rins em ratos wistar.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial androgênico de *P. niruri* sobre a morfologia testicular e produção da testosterona.
- Investigar morfometricamente os testículos e próstata.
- Analisar os pesos da próstata, testículos, epidídimos, vesícula seminal, rins e fígado e seus respectivos pesos relativos em função do peso corporal.
- Analisar dados da proporção volumétrica entre componentes do parênquima testicular, altura de epitélio seminífero e diâmetro tubular.
- Produção espermática diária estimada através da histologia quantitativa dos testículos.
- Avaliar dados da proporção volumétrica da altura de epitélio prostático, lúmen e estroma prostático.
- Avaliar a morfologia das células da linhagem espermatogênica de células de Leydig através de microscopia óptica e as relações quantitativas entre as mesmas.
- Avaliar os níveis plasmáticos de testosterona.

REFERENCIAS

ADEEKO, A.O AND DADA, O.A. Chloroquine reduces the fertility capacity of epididymal sperm in rats. **Afri. J. Med. Sci.** v. 27, n. 1-2, p. 63-68, 1998.

AHMED M, et al. Eversible anti-fertility effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on sperm parameters and fructose content in rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology.** v. 13, n. 1, p. 51-59, 2002.

ALADAKATTI R.H.; AHAMED R.N. Changes in Sertoli cells of albino rats induced by *Azadirachta indica* A. Juss leaves. **J Basic Clin Physiol Pharmacol.** v. 16, n. 1, p. 67-80, 2005.

ATANASOV, A.G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol Adv.** v. 16, n. 8, p. 1582-614, 2015.

BAGALKOTKAR, G.S.; et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **Journal Pharmacy and Pharmacology.** v. 58, n. 12, p. 1559-70, 2006.

BOIM, A. M.; HEILBERGITA P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* as a Promising Alternative Treatment for Nephrolithiasis. **International Braz J Urol.** Review Article. v. 36, n.6, p. 657-664, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira.** 5ª ed. Brasília: Anvisa, 2010a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira.** 5ª ed. Volumes 1 e 2. Brasília: Anvisa, 2010b.

CALIXTO J.B. et al. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Med Res Rev.** v. 18, n. 4, p. 225-58, 1998.

CIMANGA, R.K. In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri*. **J. Ethnopharmacol.** v. 95, n.23, p. 399-404, 2004.

COSTELLO L.C e FRANKLIN R. B. The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. **Oncology.** v. 59, n. 4, p. 269-82, 2000.

CORNELL, R. J.; ROWLEY, D.; WHELLER T. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence prostatic stroma. **Urology** v. 61, n.4, p. 870-875, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Bases patológicas das doenças.** 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

- CUNHA G, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocr Rev.** v. 8, n. 6, p. 338-62, 1987.
- DAHL E, KJAERHEIM A, TVETER K. J. The ultrastructure of the accessory sex organs of the male rat. **I Normal structure.** v. 137, n. 3, p. 345-359, 1973.
- D'CRUZ, S. C.; et al. Effects of plants and plant products on the testis. **Asian Journal of Andrology.** v.12, n. 4, p.468-479, 2010.
- FIORINI, C. et al. Sertoli Cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. **Reprod. Toxicol.** v. 18, n. 3, p. 413-421, 2004.
- FRANÇA, L. R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça** (Tese de Doutorado), Piau. Belo Horizonte: UFMG, ICB, 1991, 180p.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. **The testis of domestic mammals.** In: MARTINEZGARCIA, F. AND REGADERA, J. (eds). **Male reproduction - a multidisciplinary overview.** Madrid, Churchill Communications, p.198-219, 1998.
- GARLET, T.M.B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil.** 2000. 220 f. (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado De Fisiologia Médica** 10. Ed. RJ. Guanabara Koogan, 2002.
- JOY, K.L; KUTTAN, R. Inhibition by *Phyllanthus amarus* of hepatocarcinogenesis induced by N-Nitrosodiethylamine. **J. Bioch. Nutr.** v. 24, n. 3, p. 133-139, 1998.
- KINGHORN, A.D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **J. nat. prod.** v. 74, n.6, p. 1539–1555, 2011.
- KOTAJA N., et al. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. **Nat Methods.** v.1, n. 3, p. 249–54, 2004.
- LAIHO A, et al. Transcriptome profiling of the murine testis during the first wave of spermatogenesis. **PLoS One.** 2013.
- MALTA J.R. et al. **Das plantas medicinais aos fitoterápicos – Abordagem multidisciplinar.** João Pessoa: PET FARMÁCIA/CAPES/UFPB. 1999.
- MANJREKAR, A. P. et al. Effect of *Phyllanthus niruri* Linn. Treatment on liver, kidney and testes in CCL₄ induced hepatotoxic rats. **India Journal of experimental Biology.** v. 46, n.7 p. 514-520, 2008.
- MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Anatomia e Fisiologia.** 3.ed. Porto Alegre, Ed. Artmed, 2009.

- MARQUES, L. C. Nova legislação para fitoterápicos. In: Bonfim, J.R.A., Mercucci. V. L. (Org.) **A construção da política de medicamentos**. Hucitec. São Paulo, SP, p. 203-209.
- MATOS, F. J.A. **Introdução a fitoquímica industrial**. Fortaleza. Universidade Federal do Ceará, 1997.
- MARQUES, L.C. Nova legislação para fitoterápicos. In: BONFIM, J.R.A.E MERCUCCI V.L. (Org). **A construção da política de medicamentos**, São Paulo HUCITEC, p. 203-209, 1997.
- MEISEL, M.L., WINTERHOFF, H., JAKAT, F.W. Tyrosine inhibits the steroid genesis in leydig cells in vitro. **Life science**. v. 53, n.1, p. 77-84, 1993.
- MISHRA R.K.; SINGH S.K. Safety assessment of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) extract with respect to testicular function in mice. **Food Chem Toxicol** v. 46. N. 10, p. 3333 – 3338, 2008.
- MOORE K.L.; Dalley A.F; Agur A.M.R. **Anatomia Orientada para a Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA. 2011. 1136p.
- MUELLER, J. 1873. Euphorbiaceae. In: C.F.P. Martius & A.G.Eichler (eds.). *Flora brasiliensis* 11(2): 1-752. in: Silva e Sales: *Phyllanthus L. (Phyllanthaceae)* em Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 21, n.1, p. 79-98. 2007.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.
- NIU, Y.N. e XIA, S.J. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian J Androl.** v. 11, n.1, p. 28-35, 2009.
- OLIVEIRA A. A. **Efeito do Consumo do Tabaco na Fertilidade Masculina**. (TESE). Covilhã: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, 2010.
- PINA J.A. **Anatomia Humana dos Órgãos**. Lisboa: Lidel; 2010. 688p.
- PRADO, J. N. et al. Validação de Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Doseamento de Cápsulas de Fluoxetina. **Acta Farm. Bonaerense** v. 25, n. 3, p. 436-40, 2006.
- RICARDO, L.G.P.S. **Estudos etnobotânicos e prospecção fitoquímica das plantas medicinais utilizadas na comunidade do Horto, Juazeiro do Norte CE**. 2011. 87 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Florestais - Ecologia e Manejo dos Recursos Florestais) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, PB, 2011.
- RITTER, R.E., KERNION, J.B. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh: **Campbell's Urology**, 8ª Ed. WB Saunders, p. 3002-3003. 2002.

ROCHA, D.M.C.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult wistar rats. **Tissue & Cell**, v.31, n. 3, p.372-379, 1999.

ROSS, M.H., KAYE, G.I., PAWLINA, W. **Hystology: A text and Atlas**. 4^a ed. Baltimore: Linppicontt Willians e Wilkins, Cap 21, p. 682-724, 2003.

RUSSELL, L.D, ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian Spermatogenesis. IN: RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. (eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida: **Cache River Press**, p. 1-40, 1990.

SUBEKI, S. Antibabesialand antiplasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod.** v. 68, n. 4, p. 537-539, 2005.

SHIMA J.E. et al. The murine testicular trans-cryptome: characterizing gene expression in the testis during the progressionof spermatogenesis. **Biol Reprod.** v. 71, n. 1, p. 319–30, 2004.

SIMÕES C.M.O; et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 1.ed. Porto Alegre: UFRGS, p.60,72,73, 1986.

SIMPSON, R. J. Benign prostatic hyperplasia. **Brit J. Gen Prac.** v. 47, n. 417, p. 235-240, 1997.

SILVA, M.J. e SALES, M.F. *Phyllanthus L. (Phyllanthaceae)* em Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 21, n. 1, p. 79-98, 2007.

SIMONS, I.E.; BERMAN, E. **Environ. Health Perspective.** v. 103, p. 6771, 1995.

SOH et al. Antiplasmodial activity of various parts of *Phyllanthus niruri* according to its geographical distribution. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 3, n.12, p. 598-601, 2009.

SROUGI, M. et al. **Doenças da próstata**. Ver. Med. São Paulo. 2008 Jul.-Set. v. 87, n.3, p. 166-77.

TABOGA S.R.; VILAMAIOR P.S; GÓES R.M. Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology. **Bras Endocrinol Metab.** v.53, n.8, p. 946-55, 2009.

VARGAS, R. A. **Efeito crônico da administração de esteróide anabólico androgênico na próstata de ratos**. (Dissertação). Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2013.

VENMA P.K, et al. Effect of *Sarcostemma acidum* stem extract on spermatogenesis in male albino rats. **Asian Journal of Andrology.** v. 4, n. 1, p. 43-47, 2002.

CAPÍTULO I

EFEITO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO AQUOSO DE *Phyllanthus niruri* L. SOBRE OS TESTÍCULOS, PRÓSTATA, FÍGADO E RINS EM RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HISTOMORFOMÉTRICA E HORMONAL

RESUMO

Phyllanthus niruri é uma planta tropical, conhecida como quebra pedra. É muito utilizada na medicina popular por apresentar propriedades químicas que atuam em doenças como urolitíases, hipertensão, antimalárica, porém não há muitos trabalhos sobre sua atividade no sistema reprodutor masculino. O objetivo deste trabalho foi avaliar a histopatologia e histomorfometria de diferentes doses do extrato aquoso de *P. niruri*, sobre o testículo, próstata, fígado e rins em ratos wistar adultos. A planta foi coletada, seca e triturada. O extrato foi feito por decocção de 5g de *P. niruri* em 150 mL de água destilada. Foram utilizados 19 ratos distribuídos em três grupos: grupo 1 recebeu apenas água destilada; grupo 2 recebeu 100 mg/kg do extrato aquoso e o grupo 3 recebeu 500mg/kg do extrato aquoso. O extrato aquoso foi aplicado por 30 dias consecutivos, por meio de gavagem e posteriormente, foram eutanasiados e analisados quanto morfometria testicular e prostática e à toxicidade nos rins e fígado. Não foram visualizadas alterações no peso corporal, testicular ou prostático dos animais, o nível de testosterona triplicou nos animais tratados quando comparado aos animais do grupo controle, também foram visualizados aumento no número da população de células de Leydig, explicando o aumento da testosterona sérica. A próstata também apresentou crescimento nos parâmetros de altura e volume do órgão reafirmando a influência do extrato no aumento da testosterona. A administração das duas dosagens não provocaram lesões relevantes nos parênquimas renal e hepático nem alterações nos órgãos reprodutores.

Palavras-chave: Plantas Mediciniais. Quebra-pedra. Toxicidade. Morfometria Testicular. Próstata.

ABSTRACT

Phyllanthus niruri is a tropical plant, known as stone breaker. It is widely used in folk medicine due its chemical properties against many diseases, as urolithiasis, hypertension and malaria. However, its activity on the male reproductive system is poorly investigated. The aim of this study is to evaluate the effect of aqueous extract of *P. niruri* in different concentrations on the testis, prostate, liver and kidney in adult Wistar rats. The plant was collected, dried and crushed. The extract was produced by decoction 5 g of *P. niruri* in 150 ml of distilled water. Nineteen rats were divided into three groups: Group 1 received only distilled water, Group 2 received 100 mg/kg of the aqueous extract and Group 3 received 500 mg/kg of the aqueous extract. The animals were treated by gavage for 30 days, when they were euthanized. Prostate and testicular morphology and kidney and liver toxicity were analyzed. Body, testicular and prostatic weight did not differ. Testosterone levels of treated animals were three times higher than control animals. In addition, Leydig cells population increased, explaining the increase in testosterone levels. Prostatic epithelium height and volume also increased, confirming the influence of the extract in increasing testosterone levels. The administration of the two different concentration did not cause injury to renal and liver parenchyma or alteration to the others reproductive organs.

Key-words: Medicinal Plants. Stone Breaker. Toxicity. Testicular Morphometry. Prostate.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para tratamento de doenças tem sido descrito há milhares de anos pelo homem na busca por uma melhor qualidade de vida e sobrevivência, utilizando-se do conhecimento empírico e informações repassadas de geração a geração, representando muitas vezes o único recurso terapêutico disponível a população, sobretudo a população mais carente (FRANCO, 2005; MACIEL et al. 2002).

O gênero *Phyllanthus*, que pertencia à família *Euphorbiaceae*, foi desmembrado e classificado na família *Phyllanthaceae* (SILVA e SALES, 2007). Esse gênero possui mais de 600 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais do mundo (WEBSTER 1956; 2002ab), é amplamente utilizado na medicina tradicional para tratamento de inúmeras doenças, sendo mais utilizado nas que acometem o sistema urinário. Dentre as espécies do gênero *Phyllanthus*, a *P. niruri*, conhecida como quebra-pedra, é nativa da Floresta Amazônica e outras áreas tropicais em todo o mundo, como Bahamas, sul da Índia, China, Gana, Nigéria, entre outros (SAMALI et al. 2012; BAGALKOTKAR et al. 2006).

Várias pesquisas têm sido realizadas para identificar e avaliar os compostos químicos presentes na planta. Em muitas delas, já foram identificadas e isoladas constituintes ativos que possuem atividade biológica tais como lignina, taninos, cumarinas, terpenos, flavonóides e alcalóides, estes encontrados nas folhas, caule e raízes dessa planta. Lipídios comuns, esteróis e flavanóides também foram encontrados (DHAR et al. 1968; MARKOM et al. 2007).

O extrato da planta inteira ou de suas partes é utilizado para várias doenças tais como cálculo renal, disenteria, diabetes, gripe, como diuréticos, e hepatite B, entre outras (BAGALKOTKAR et al. 2006; THIPPESWAMY et al. 2011). Está inclusa na relação nacional de plantas medicinais (RENISUS), de interesse ao (SUS) Sistema Único de Saúde, por ser uma espécie com potencial para tratamento de diversas doenças (PHARMACIA BRASILEIRA, 2009).

Estudos *in vivo* e *in vitro* do extrato de *P. niruri* demonstraram ação hepatoprotetora frente a toxinas que acometem o fígado (BAGALKOTKAR et. al., 2006). Segundo Subeki, (2005), Cimanga, (2004) e Simons et al, (1995), o extrato de *P. niruri* possui atividade anti malárica, outros autores como (MEISEL, 1993; ADEEKO e

DAADA, 1998), relataram que agentes com atividade contra a malária possuem efeitos antifertilidade, que podem estar associados a componentes químicos da planta como a quinina e cloroquinina.

Apesar das inúmeras pesquisas, não existem muitos relatos sobre os efeitos no sistema reprodutor. Várias plantas utilizadas na medicina popular com importantes propriedades farmacológicas possuem efeitos adversos para as funções reprodutivas masculinas em ratos e humanos, dentre elas *Ocimum sanctum* (AHMED et al., 2002), *Azadirachta indica*, (ALADAKATTI e AHAMED, 2005), *Syzygium aromaticum* (MISHRA e SINGH, 2008), *Sarcostemma acidum* (VENMA et al., 2002).

Diante da escassez de trabalhos dos efeitos do chá do *P. niruri* sobre os órgãos do sistema reprodutor masculino, fígado e rins justifica-se a realização deste trabalho, os resultados poderão revelar alternativas de tratamento a distúrbios da espermatogênese.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *Phyllanthus niruri*

Exemplares de *P. niruri* foram coletadas em Cruz de Rebouças, município de Igarassu, PE sob as coordenadas de latitude 7° 50' 03" S e longitude 34° 54' 23" W. A identificação taxonômica foi realizada no herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, registrada e tombada sob o número de registro 51.757.

2.2 PROCESSAMENTO DO *Phyllanthus niruri*

Espécimes inteiros foram coletados, secados em estufa a 50 °C, pesados em balança comercial e triturados com auxílio de um liquidificador até ficarem na consistência de pó.

A extração aquosa foi realizada por decocção de 5 g do pó de *P. niruri* para 50 ml de água destilada. A mistura foi fervida por 10 minutos, filtrada em papel de filtro,

acondicionada em frascos de vidro, posteriormente liofilizada e armazenada a -20 °C até ser usada (SOH et al., 2009).

2.3 MODELO ANIMAL

Foram utilizados 19 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), oriundos do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal DMFA/UFRPE, os quais foram mantidos a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo circadiano.

Os animais foram alimentados com ração industrial peletizada, em níveis nutricionais adequados. Água e comida foram oferecidos *ad libitum* durante todo o experimento.

Esse projeto foi aprovado pela comissão de ética animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco com o processo nº 23082.015149/2014 e licença 132/2014.

2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos tinham de quatro a seis meses de idade e pesavam entre 300 e 450 gramas. Foram formados três grupos experimentais de modo aleatório G1, G2 e G3.

Grupo G1 n=6: Animais controle que receberam água destilada;

Grupo G2 n=6: Animais que receberam 100 mg/Kg do extrato aquoso de *P. niruri*;

Grupo G3 n=7: Animais que receberam 500 mg/kg do extrato aquoso de *P. niruri*;

Os animais receberam o extrato aquoso de *P. niruri* por meio de gavagem (orogástrica) por 30 dias consecutivos. Semanalmente foram pesados e suas doses ajustadas ao peso correspondente.

2.5 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a eutanásia por injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 25mg/kg associada à xilazina 10mg/kg na mesma seringa e aprofundadas com tiopental (FANTONI; CORTOPASSI, 1994).

Posteriormente, foi coletado sangue total por punção no seio venoso, seguido de centrifugação e acondicionamento de duas alíquotas de 1 ml de plasma, para dosagem

de testosterona. Após coleta de sangue, fez-se perfusão intracardíaca com NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L; AKZO ORGANON TEKNIKA) e nitroprussiato de sódio (100mg/L; SIGMA). Em seguida, os animais foram perfundidos com glutaraldeído a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos. Após a perfusão foram removidos e pesados: testículos, epidídimos, próstata, glândulas seminais, rins e fígado.

2.6 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

Foram coletados testículos, epidídimo e próstata que foram fixados em Glutaraldeído 4%. Os testículos e próstata foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA), permanecendo imersos em tampão fosfato por 2 horas, sendo posteriormente desidratados em séries crescentes de alcoóis e incluídos na resina plástica. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1 % e analisados morfológicamente e morfometricamente.

2.7 ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

O índice gonadossomático foi calculado através da soma do peso de ambos os testículos, dividido pelo peso corporal, sendo referenciado em porcentagem (BARBOSA et al. 2012).

2.8 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E HISTOPATOLÓGICA DOS TESTICULOS

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidos em aumento de 100X usando um sistema de captura de imagem acoplado a um microscópio óptico Olympus BX-51.

O diâmetro tubular médio para cada rato foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos

aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. Os valores encontrados foram resultantes da media de duas retas diametralmente opostas.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram calculados usando um sistema de captura de imagem onde foi inserida uma graticula micrométrica com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT), por testículo, expresso em metros foi estimado a partir da razão do volume absoluto ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo (VATS) por R^2 (onde R é o diâmetro tubular/2) e o valor de π : $CT = VATS/\pi R^2$ (ATTAL e COUROT, 1963).

Foi realizada a contagem de espermatogônias, espermatócitos I em estágio de pré-leptóteno e paquíteno, espermatídes arredondadas e nucléolos de células de Sertoli em cinco túbulos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero. A população de células de Sertoli foi obtida através da contagem do número de células com o nucléolo visível. Após isso, foi realizada a correção do número obtido utilizando a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962), conforme segue:

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

O diâmetro nucleolar médio (DM) representa a média dos diâmetros de 05 nucléolos de células de Sertoli para cada animal dos grupos. A população foi estabelecida através do resultado da multiplicação do número corrigido pelo comprimento total dos túbulos seminíferos em micrômetros (μm) e dividido pela espessura do corte.

A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Júnior et al. (2006): $PED = N^\circ \text{ total de}$

células de Sertoli por testículo X a proporção de espermátides redondas no estágio VII x estágio VII com frequência relativa / duração do estágio (dias).

O diâmetro nuclear das células de Leydig foi obtido através da média de duas retas diametralmente opostas em aumento de 1000x. Foram mensurados 30 núcleos por animal e foi aplicada a fórmula do volume da esfera ($4/3\pi R^3$) para a obtenção do volume individual da célula.

A proporção volumétrica de núcleo/citoplasma foi realizada através da contagem de 1000 pontos entre citoplasma e núcleo, utilizando um retículo com 441 intersecções no aumento de 1000x. A partir dessa proporção foi calculado o volume citoplasmático e o volume celular. O volume citoplasmático foi calculado pela multiplicação da porcentagem de citoplasma pelo volume nuclear, e dividido pela porcentagem nuclear. O volume individual da célula de Leydig foi estimado através da soma entre os valores do volume nuclear e volume citoplasmático (MORAIS et al., 2014).

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig por testículo, obteve-se a população dessas células por testículo. Em seguida, esse valor foi dividido pelo peso líquido para obtenção da população por grama de testículo.

2.9 PROCESSAMENTO DE MATERIAL PARA HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos dos rins e fígado foram processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em parafina, cortados em micrótomo ajustados para 4 micrômetros e as lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.), segundo metodologia descrita por Behmer, Tolosa e Freitas Neto (1976). As análises foram realizadas em microscópio óptico. Todo processamento para microscopia óptica foi realizado na Área de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária e na Área de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal DMFA/UFRPE.

2.9.1 TESTOSTERONA SÉRICA

As amostras sanguíneas obtidas por meio de punção cardíaca, foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo anticoagulante e posteriormente foi levado

a centrifuga por quinze minutos a 2500 rpm. Após a precipitação das células sanguíneas, o soro sobrenadante foi colhido por micropipetas, armazenado em eppendorff e guardado em freezer até a realização das dosagens de testosterona. A dosagem foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm, conforme descrito por Brown et al. (2004).

3 MORFOMETRIA PROSTÁTICA

Fragmentos da próstata foram inclusos em resina plástica, posteriormente foram confeccionadas lâminas histológicas a 4 µm e coradas com azul de toluidina com 1 % de borato de sódio. Para medição da altura do epitélio prostático acinar foi considerada a distância linear, medida em micrômetros, entre superfície luminal e sua membrana basal. Foi utilizado a função “straight line” do software ImageJ versão 1,48 (NIH, Bethesda, Maryland, EUA) para esta análise. A média de cada animal foi calculada após 250 medições com aumento de 100X, adaptada de Vargas (2013).

3.1 PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DA PRÓSTATA

As densidades de área do lúmen acinar, epitélio e do estroma foram calculadas com auxílio do software ImageJ. Em cada campo histológico, foi aplicado uma grade de 108 pontos e os pontos incidentes sobre o lúmen, epitélio e estroma foram contados e expressos em porcentagem. Para cada animal, a média foi determinada em 25 campos com aumento de 400X, adaptada de Vargas (2013).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa GRAPHPAD PRISMA 5. Foram realizados os testes ANOVA e pos hoc de Tukey e os dados representados como média e desvio padrão. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

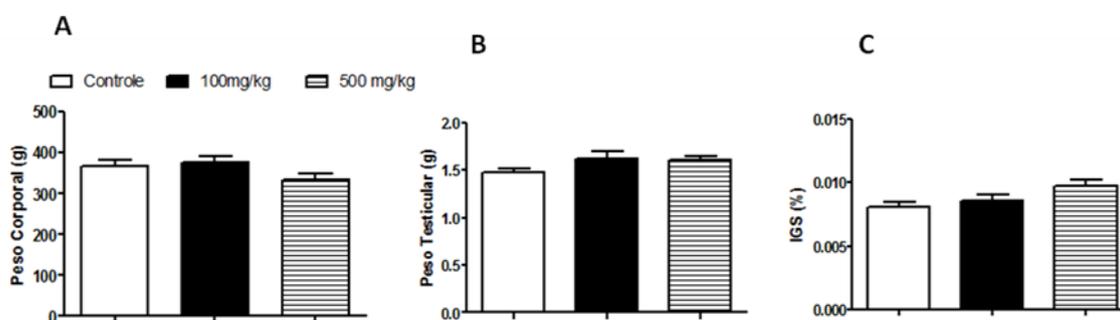
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO PESO CORPORAL, EPIDÍDIMO, PRÓSTATA, VESÍCULA, TESTÍCULOS E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS)

De acordo com a figura 1-A e tabela 1 não houve diferença significativa com relação ao peso corporal dos animais nos grupos analisados ($p = 0,1256$). O peso testicular não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados, porém, é possível visualizar na figura 1-B uma leve tendência de aumento nos grupos tratados com 100 e 500 mg/kg em relação ao grupo controle ($p= 0,1627$).

O índice gonadossomático (Figura 1-C) aumentou significativamente nos animais do grupo que recebeu maior dose em relação ao grupo controle ($p= 0,0451$). Isso possivelmente ocorreu devido a tendência proporcional de aumento no peso testicular e redução no peso corporal observada no grupo 500 mg/kg.

Figura 1. A- Peso corporal (g), B- Peso testicular (g) e C- Índice gonadossomático – IGS (%) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.



Não foi observada diferença estatística no peso da próstata ($p= 0,3332$) (Figura 2-A) entre os grupos estudados, embora seja possível notar uma tendência de aumento (31,14%) neste parâmetro no grupo 500 mg/kg quando comparado com o grupo controle.

A glândula seminal (Figura 2-B) apresentou diferença significativa entre o grupo controle e 100 mg/kg com ($p= 0,0275$). Isso demonstra que no grupo de 100 mg/kg

houve aumento no peso da glândula quando comparado com o controle. Na administração de 500 mg/kg houve tendência de aumento (29%) em relação ao grupo controle mas não foi significativamente estatístico.

Em relação ao peso do epidídimo houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,0499$) (Figura 2-C). Não foram observadas diferenças significativas nos grupos tratados em relação ao peso do fígado e rim. Dados referentes aos achados histopatológicos estão demonstrados na tabela 7 e Figura 8 e 9.

Figura 2. A- Peso de Próstata (g), B- Glândula seminal (g) e C- Epidídimo (g) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.

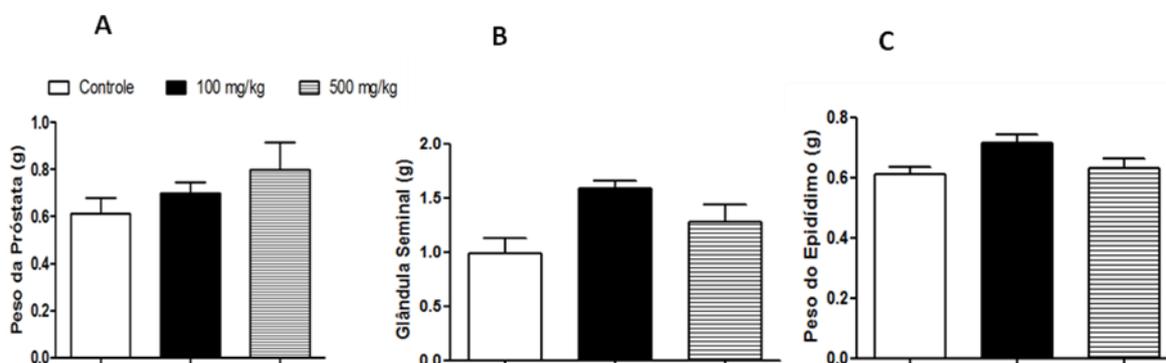


Tabela 1. Parâmetros biométricos de ratos Wistar adultos do grupo controle e tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

	Grupos experimentais		
	Controle	100 mg/Kg	500 mg/Kg
Peso corporal (g)	365,30 ± 40,03	376,00 ± 34,62	334,60 ± 33,18
Testículo (g)	1,47 ± 0,09	1,62 ± 0,20	1,61 ± 0,09
Epidídimo(g)	0,61 ± 0,05 ^a	0,72 ± 0,06 ^b	0,63 ± 0,09 ^a
IGS (%)	0,008 ± 0,001 ^a	0,007 ± 0,001 ^a	0,010 ± 0,001 ^b
Próstata (g)	0,61 ± 0,16	0,70 ± 0,11	0,80 ± 0,31
Glândula seminal (g)	0,99 ± 0,33 ^a	1,59 ± 0,19 ^b	1,28 ± 0,43 ^a
Peso Fígado (g)	12,75±1,79	13,58±1,11	11,99 ± 2,12
Peso Rim (g)	1,59±0,26	1,57±0,24	1,51 ± 0,21

IGS (%) = Índice gonadossomático. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$).

5.2 RELAÇÃO VOLUME DO TÚBULO SEMINÍFERO (mL) X VOLUME DO INTERSTÍCIO (mL)

Não houve diferença significativa no volume ocupado pela região tubular ($p=0,2338$) entre os grupos experimentais. Apesar disso houve uma leve tendência de aumento de 7 % e 9 % nas dosagens de 100mg/kg e 500mg/kg respectivamente, quando comparados ao grupo controle.

No volume ocupado pelo interstício, houve diferença significativa do grupo controle e 100 mg/kg e entre os grupos de 100 e 500mg/kg ($p=0,0048$). Esse aumento provavelmente está relacionado ao aumento dos níveis séricos de testosterona e ao parâmetro de população de células da região do interstício (Figuras 3-A e B).

Figura 3. A- Volume Tubular (mL) e B- Volume Ocupado pelo Interstício (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.

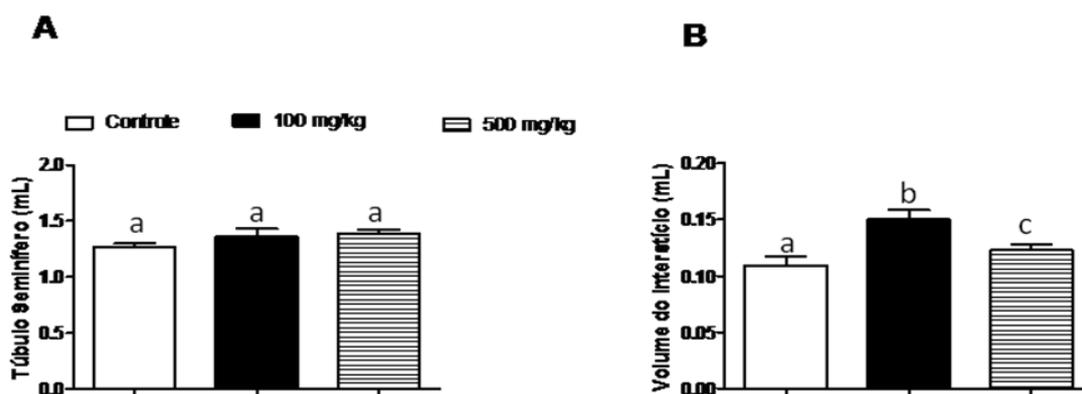


Tabela 2. Volume Tubular (mL) e Volume Intersticial (mL) do túbulo seminífero dos animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*.

	Grupo experimental		
	Controle	100 mg/Kg	500 mg/Kg
Volume Tubular (mL)	1,26±0,08	1,36±0,18	1,38±0,09
Volume do Interstício (mL)	0,109±0,020	0,150±0,022	0,123±0,014

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$)

5.3. COMPARTIMENTO TUBULAR

O diâmetro e a altura do epitélio seminífero não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o grupo controle (Figura 4-A, 4-B e Tabela 3).

Figura 4. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero de testículo de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

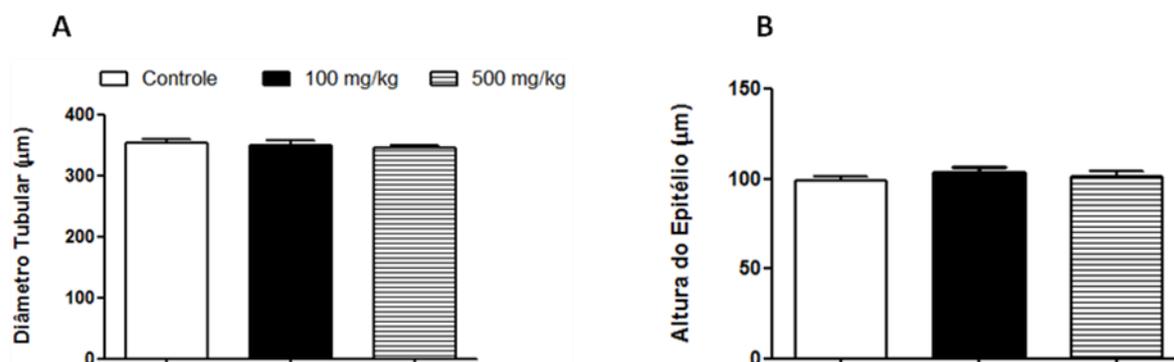


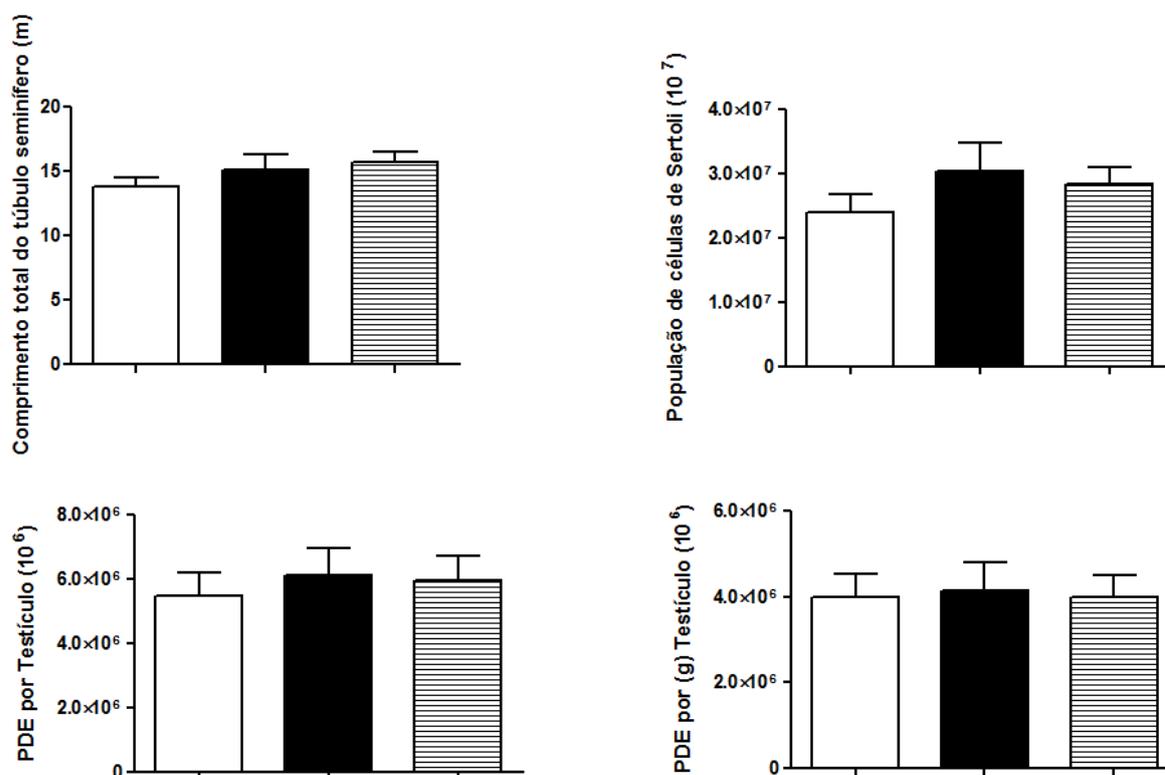
Tabela 3. Diâmetro tubular, Altura do Epitélio Seminífero, Comprimento Total do Túbulo Seminífero (m), População de Células de Sertoli ($\times 10^6$), Produção Espermática Diária/Testículo ($\times 10^6$) e Produção Espermática Diária por Grama de Testículo de animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*.

	Grupos experimentais		
	Controle	100 mg/Kg	500 mg/Kg
Diâmetro tubular (g)	353,3 \pm 18,77	350,6 \pm 17,75	346,6 \pm 11,97
Altura do epitélio seminífero (g)	99,47 \pm 4,78	103,5 \pm 7,94	101,4 \pm 7,24
Comprimento Total Tubular (m)	13,87 \pm 1,63	15,19 \pm 2,83	15,76 \pm 1,99
População de célula de Sertoli (10^6)	2,40 \pm 0, 67	3,04 \pm 0,10	2,84 \pm 0,69
PDE testículo (10^6)	5,47 \pm 1,81	6,10 \pm 2,11	5,96 \pm 2,00
PDE/g de testículo (10^6)	3,98 \pm 1,34	4,14 \pm 1,57	3,98 \pm 1,37

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

Figura 5 A- Comprimento total do túbulo (m), B- População de células de Sertoli (10^7), C- Produção espermática diária (PDE) por testículo (10^6) e Produção espermática diária (PDE) por (g) de testículo (10^6) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.

□ Controle ■ 100 mg/kg ▨ 500 mg/kg



De acordo com a Tabela 3, o comprimento total do túbulo seminífero (μm) não diferiu estatisticamente ($p= 0,3174$), apesar disso esse parâmetro apresentou tendência de aumento de 9% e 13% nos grupos tratados com 100 e 500mg/kg, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 5-A).

A população de células de Sertoli não diferiu significativamente entre os grupos experimentais ($p= 0,4078$) (Tabela 3). Contudo, houve tendência de aumento nos grupos tratados com extrato na dosagem de 100mg/kg (26,6%) e 500mg/kg (18%) quando comparado ao grupo controle (Figura 5-B).

A produção espermática diária por testículo teve um aumento de 11 % no grupo 100mg/kg em relação ao grupo controle, embora não tenha sido estatisticamente significativo ($p= 0,8440$) (Tabela 3), (Figura 5-C).

Adicionalmente, a produção espermática diária por grama de testículo (Tabela 3) também não apresentou diferença estatística entre os grupos avaliados ($p=0,9742$), (Figura 5-D).

Na Figura 7, observam-se fotomicrografias evidenciando o compartimento tubular no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero nos tratamentos e o interstício evidenciando as células de Leydig.

5.4 COMPARTIMENTO INTERSTICIAL (TESTOSTERONA E CÉLULAS DE LEYDIG)

No nível de testosterona sérica não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Apesar disso, os níveis do hormônio chegaram a triplicar após o tratamento, em ambas as concentrações, em comparação com o grupo controle ($p= 0,1216$).

O diâmetro nuclear da célula de Leydig diminuiu no grupo tratado 500mg/kg quando comparado ao grupo controle ($p= 0,0378$). Com relação ao volume das células de Leydig houve redução significativa entre o grupo controle e 500 mg/kg ($p= 0,0069$). A população de células de leydig aumentou significativamente entre os grupos tratados em relação ao controle ($p < 0.0001$). Na Figura 7 B, D e F, fotomicrografias do compartimento intersticial testicular mostram a disposição das células de Leydig nos grupos experimentais.

Figura 6. A- Níveis séricos de testosterona, B- Diâmetro Nuclear de Leydig (μm), C- Volume de Leydig (μm^3) e D- População de Células de Leydig (10^6) por testículo em ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.

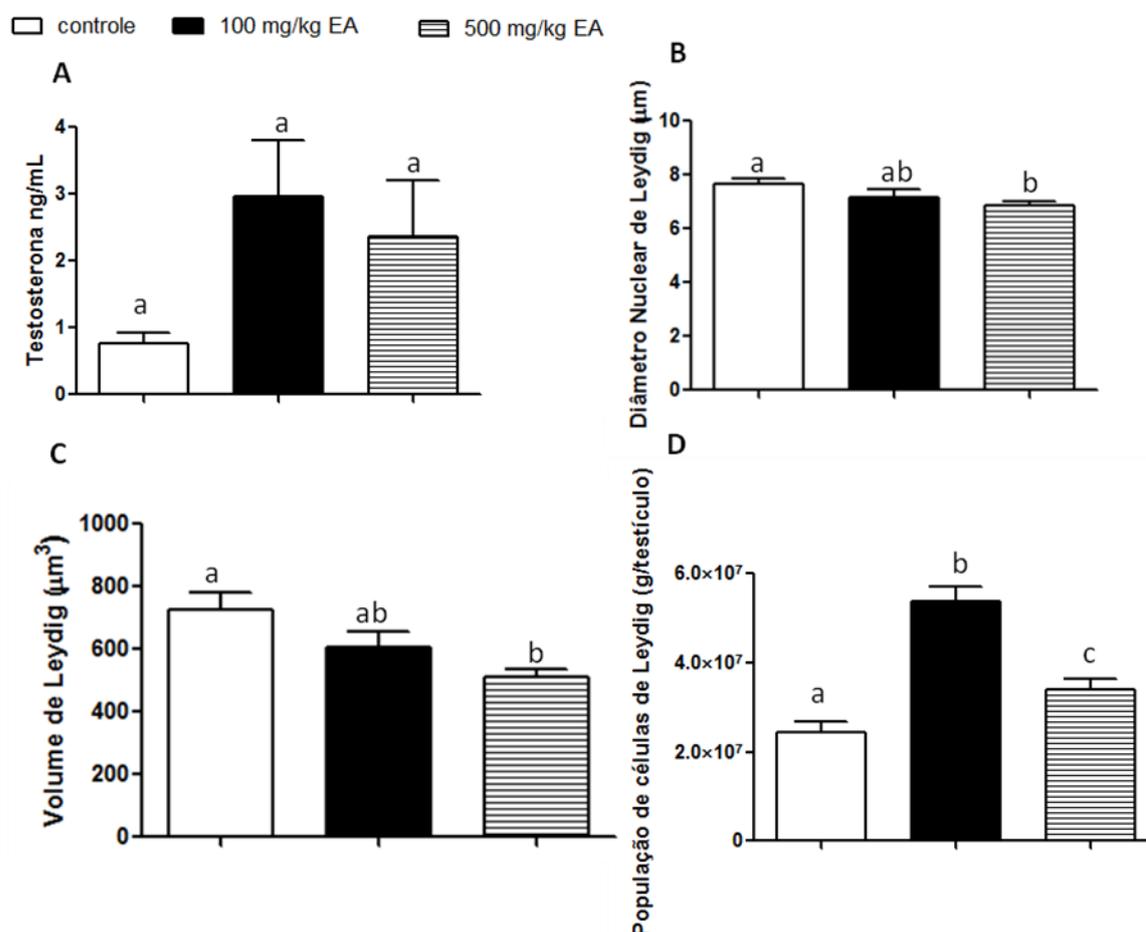
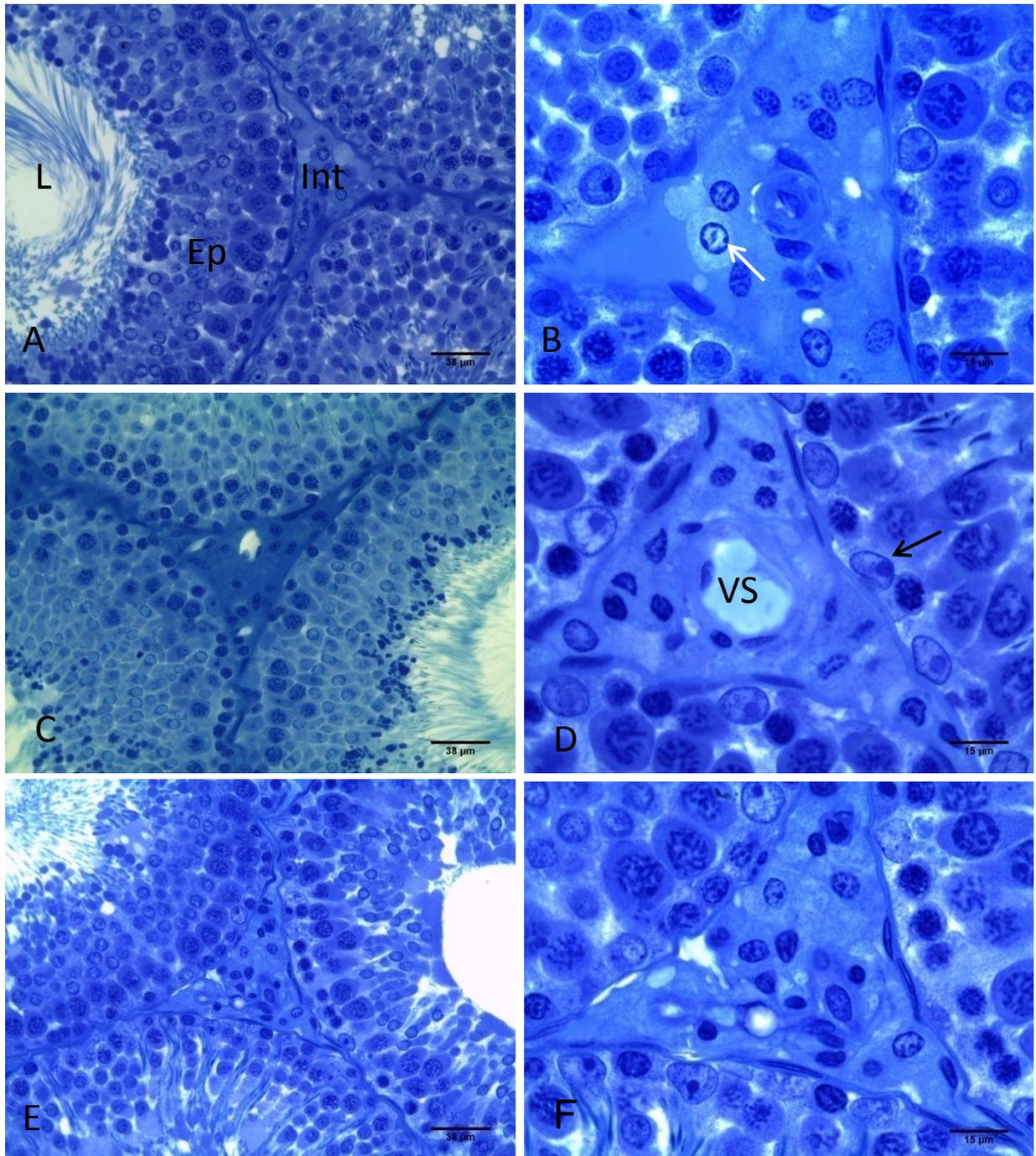


Tabela 4. Níveis de Testosterona Plasmática (nMol/L), Diâmetro Nuclear de Células de Leydig (μm), Volume Individual de Célula de Leydig (μm^3) e População de Células de Leydig dos animais dos grupos controle e tratados com 100 e 500 mg/kg de extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*.

	Grupos experimentais		
	Controle	100 mg/Kg	500mg/kg
Testosterona (ng/mL)	0,76±0,40 ^a	2,96±2,06 ^a	2,36±2,22 ^a
Diâmetro nuclear da célula de Leydig (μm)	7,67± 0,44 ^a	7,18± 0,63 ^{ab}	6,85± 0,47 ^b
Volume da célula de Leydig (μm^3)	727,5± 125,2 ^a	606,4± 122,3 ^{ab}	508,3± 66,95 ^b
População da célula de Leydig (g/testículo)	2,44±5,67 ^a	5,39±7,53 ^b	3,39±6,43 ^c

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

Figura 7 Fotomicrografia comparando o compartimento tubular no estágio 7 da espermatogênese e o compartimento intersticial em ratos do grupo controle (A-B), 100mg/kg de *P. niruri* (C-D), e 500 mg/kg de *P. niruri* (E-F). L- lúmen; Epi – Epitélio; Int – Interstício; VS – vaso sanguíneo; seta preta indica células de Sertoli; seta branca indica célula de Leydig. Aumento de 400x nas figuras A, C e E e aumento de 1000x nas figuras B, D e F.



5.5 MORFOMETRIA PROSTÁTICA

A altura do epitélio prostático não apresentou diferença estatística significativa, ($p= 0,0870$) contudo houve tendência de aumento 18 % no grupo tratado com 500mg/kg em relação aos grupos controle e 100mg/kg como representado na (Figura 9-A, Tabela 5).

Quanto ao volume do epitélio prostático verificou-se que o tratamento não promoveu alteração significativa entre os grupos tratados ($p=0,4013$). Mas houve uma Tendência de aumento de 22 % do grupo 500 mg/kg quando comparado aos grupos controle e 100mg/kg (Figura 9-B, Tabela 5).

Em relação à densidade do estroma não houve diferença entre os grupos tratados com 100mg/kg e 500mg/kg ($p=0,4806$), entretanto ambos os tratamentos apresentaram tendência de aumento 12 % e 27 % respectivamente. Já no parâmetro de volume do Lúmen igualmente não houve diferença significativa entre os grupos analisados, contudo foi verificado tendência de aumento de 16 % no grupo tratado com 100 mg/kg e 9 % no grupo tratado com 500 mg/kg em relação ao grupo controle (Figura 9-C e D, Tabela 5).

Figura 8. A- Altura do Epitélio Prostático (μm), B- Volume do Epitélio Prostático (mL), C- Volume do Estroma Prostático (mL), C- Volume do Lúmen Prostático (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.

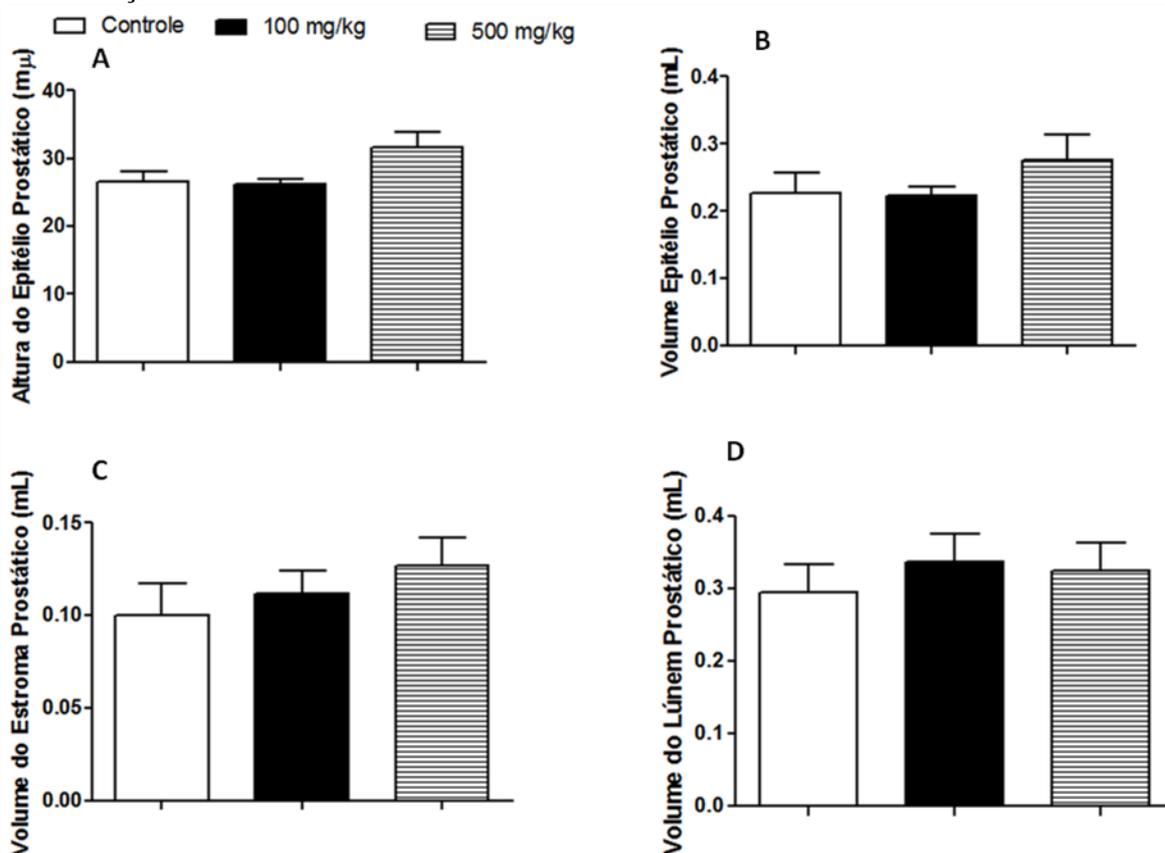
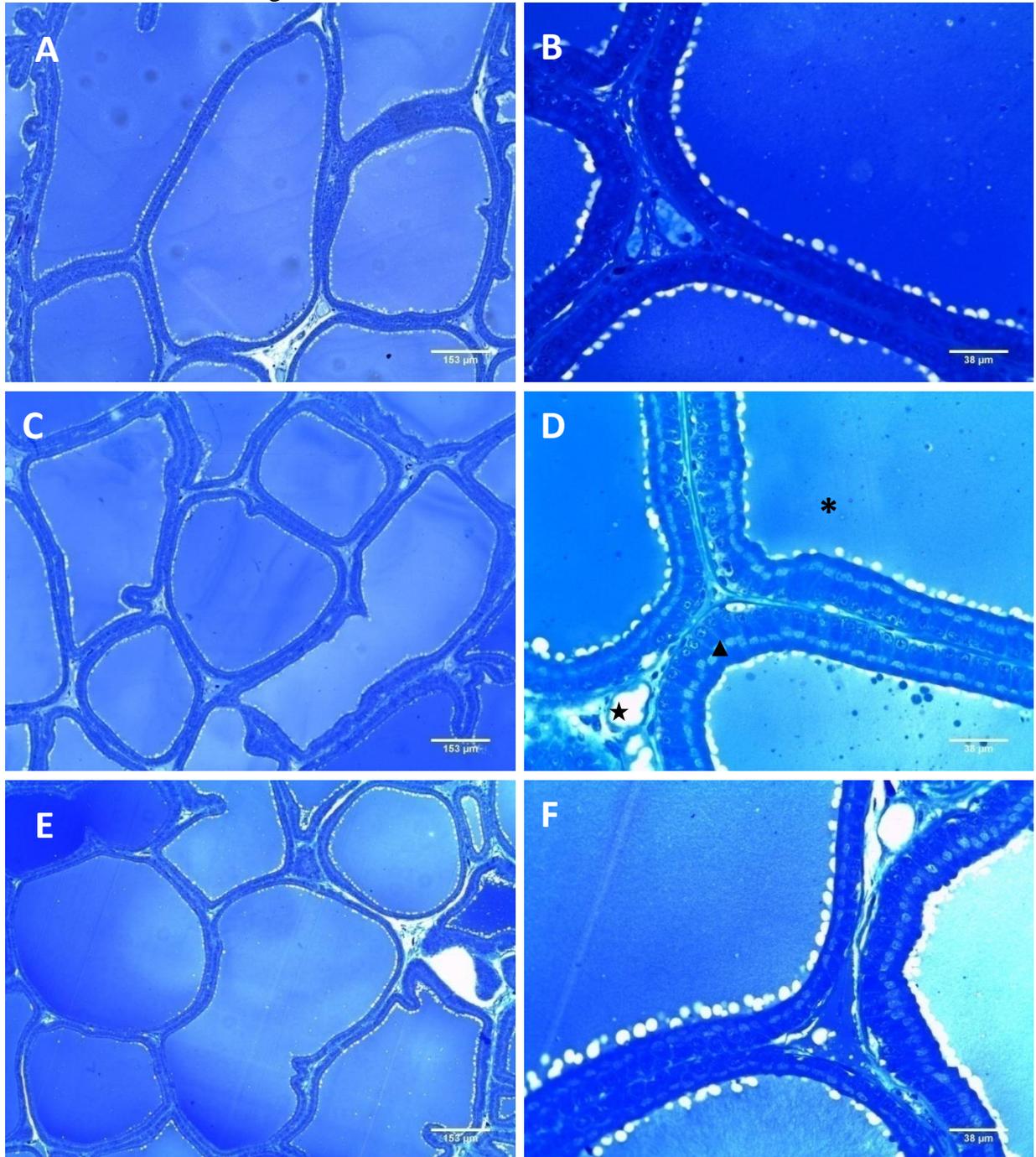


Tabela 5. Altura do epitélio prostático (μm), Volume do Epitélio Prostático (mL), Volume do Estroma Prostático (mL), Volume do Lúmen Prostático (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.

	Grupos experimentais		
	Controle	100 mg/Kg	500mg/kg
Altura do Epitélio Prostático (μm)	26,62±3,76	26,10±1,83	31,54±5,73
Volume do Epitélio Prostático (mL)	0,226± 0,076	0,223±0,030	0,276± 0,093
Volume do Estroma Prostático (mL)	0,100± 0,043	0,112±0,029	0,127±0,037
Volume do Lúmen Prostático (mL)	0,296±0,094	0,338±0,084	0,325±0,094

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

Figura 9. Fotomicrografia da próstata, A e B animais controle; C e D animais tratados com 100mg/kg, evidenciando o lúmen, epitélio e estroma prostático; E e F, animais tratado com 500mg/kg de extrato aquoso de *P. niruri*. Estrela indica região do estroma, cabeça da seta o epitélio prostático, o asterisco indica o lúmen. As figuras A, C e E com aumento de 100X e as figuras B, D e F, aumento de 400X.



5.6 FÍGADO E RINS

As tabelas 6 e 7 descrevem os achados histopatológicos encontrados na análise do fígado e rins dos animais que receberam o extrato aquoso de *P. niruri*.

Tabela 6. Achados histopatológicos em fígado de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato aquoso *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

	Controle	100 mg/kg	500 mg/kg
Achados	Fígado		
Necrose de coagulação	+	++	-
Vacuolização	+	+	-
Congestão	-	+ / +++	-
Hipertrofia	+	++	++
Hiperplasia	+	+	++
Dilatação de capilares sinusóides	-	+	-
Hepatócitos grandes/binucleados	+ / +	+	+

Tabela 7. Achados histopatológicos de rins de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato aquoso *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

	Controle	100 mg/kg	500 mg/kg
Achados	Rim		
Vacuolização	-	+	+
Descamação celular	-	-	+
Debris celular	+	++	+
Atrofia glomerular	+	+ / +++	+
Nefrite	-	-	-
Congestão corticomedular	+	++	+ / +++
Glomeronefrite	+	+ / +++	-

Figura 10 Fotomicrografias do parênquima de fígado de ratos tratados ou não com diferentes doses de extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* corados com HE. Figura 8A – Fotomicrografia de parênquima hepático de animais do grupo controle, aumento 100x. Figura 8B - Detalhe de parênquima hepático de animais do grupo controle. Observar presença de hepatócitos grandes binucleados (cabeça de seta), estrela indica necrose de coagulação, aumento 400x. Figura 8C - Fotomicrografia de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 100 mg/kg, aumento 100x. Figura 8D – Detalhe de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 100 mg/kg. Observar presença de hepatócitos grandes e binucleados (cabeça de seta), dilatação de capilares sinusoides (asterisco), seta preta indica vacuolização, aumento 400x. Figura 8E – Fotomicrografia de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 500 mg/kg, aumento 100x. Figura 8F – Detalhe de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 500 mg/kg. Observar necrose de coagulação (estrela), aumento 400x.

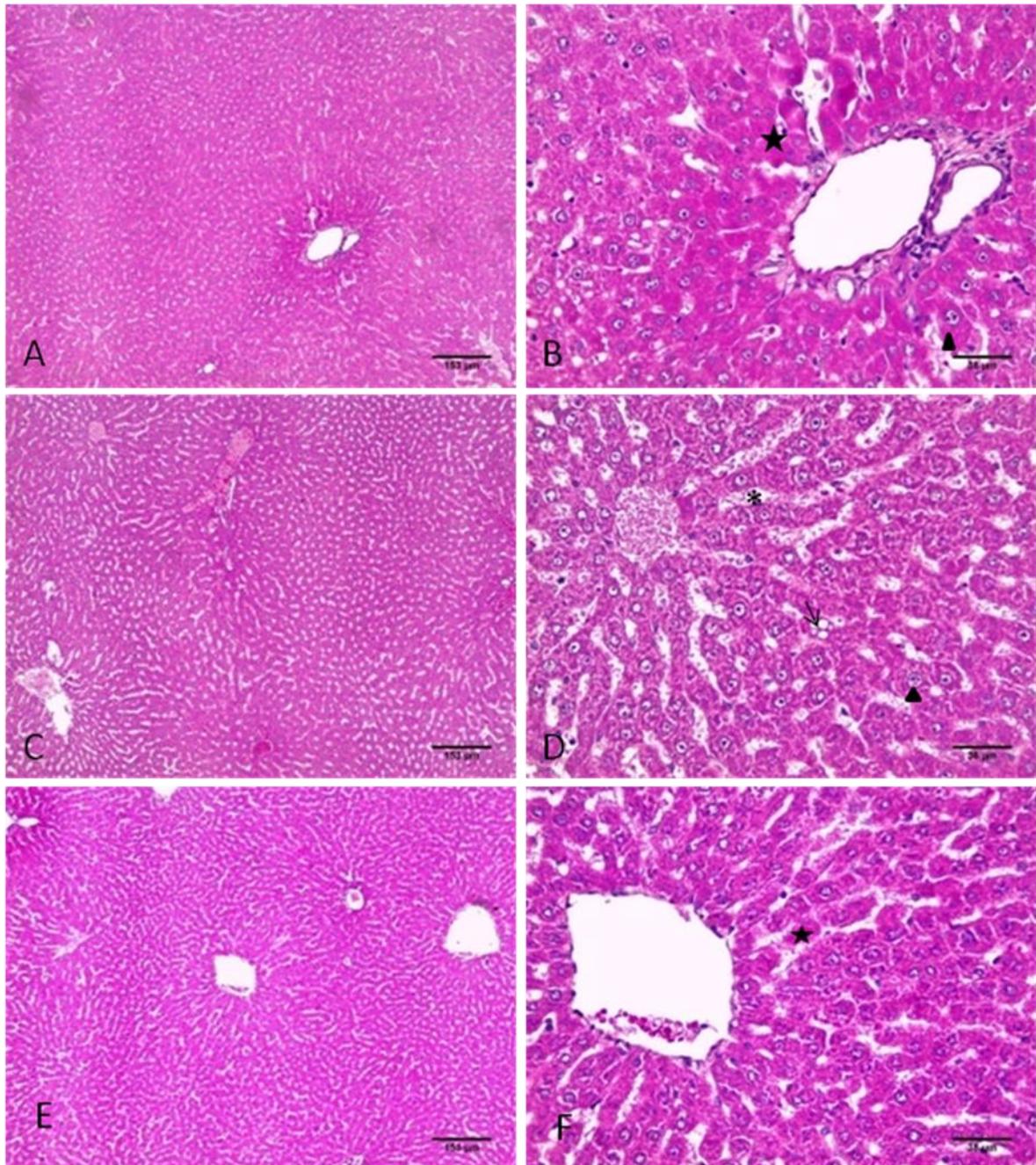
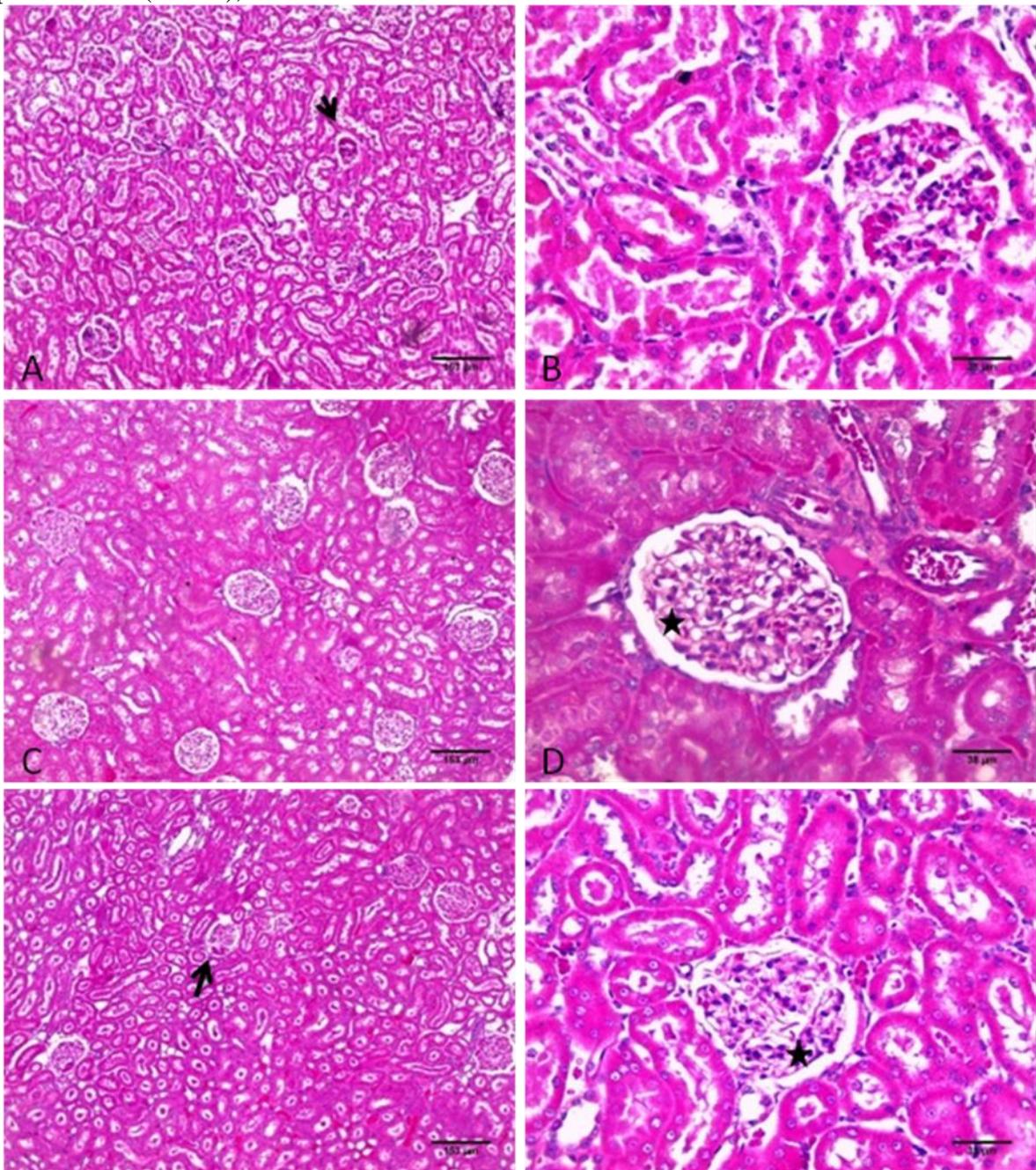


Figura 11 Fotomicrografias do parênquima renal de ratos tratados ou não com diferentes doses de extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* corados com HE. Figura 9A – Fotomicrografia de parênquima renal de animais do grupo controle. Notar atrofia glomerular (seta preta), aumento 100x. Figura 9B - Detalhe de glomérulo em atrofia de animais do grupo controle, aumento 400x. Figura 9C - Fotomicrografia de parênquima renal de animais do grupo tratado com 100 mg/kg, aumento 100x. Figura 9D – Detalhe de parênquima renal de animais do grupo tratado com 100 mg/kg de *P. niruri*. Observar glomerulonefrite proliferativa (estrela), aumento 400x. Figura E – Fotomicrografia de parênquima renal de animais do grupo tratado com 500 mg/kg de *P. niruri*. Notar presença de atrofia glomerular (seta preta), aumento 100x. Figura 9F – Detalhe de parênquima renal de animais do grupo tratado com 500 mg/kg de *P. niruri*. Observar glomerulonefrite proliferativa (estrela), aumento 400x.



6 DISCUSSÃO

Os pesos corporal, testicular e prostático não apresentaram diferença significativa no presente estudo. Por outro lado, os pesos do epidídimo e da glândula vesicular aumentaram significativamente em relação ao grupo controle. Corroborando esses resultados, Akomolafe et al. (2015) utilizando o extrato aquoso das folhas de *Tetracarpidium conophorum* encontraram aumento nos pesos corporal, testicular e epididimal de forma significativa. Apesar disso, os pesos das glândulas seminal e prostática também sofreram aumento, mas não foi estatisticamente significativo.

Adicionalmente, Hardani et al. (2015) observaram que o peso testicular de ratos Wistar tratados, durante 30 dias, com o extrato aquoso de aipo (*Apium graveolens L.*) tendeu a aumentar, quando comparados com o grupo controle. Já o peso epididimal aumentou significativamente nos animais tratados com a maior dosagem do extrato. Devido a isso, sugeriram que esse extrato promoveu aumento no número de células e, conseqüentemente, elevação na taxa de fertilidade dos ratos, promovendo assim melhoras na espermatogênese.

Já no estudo realizado por Parhizkar et al. (2014) não foram observadas diferenças estatística no volume dos testículos de ratos tratados com o extrato aquoso de *Phaleria macrocarpa*. O peso testicular é um parâmetro importante e que tem relação direta com comprimento de túbulos seminíferos, população de células de Sertoli e produção espermática (FRANÇA et al. 2005). No presente trabalho foi verificado que esses parâmetros sofreram aumento, decorrentes da utilização do extrato aquoso do *Phyllanthus niruri*, corroborando com o descrito por França et al. (2005).

O índice gonadossomático (IGS) é uma relação que indica a porcentagem do peso testicular presente no corpo (CALDEIRA et al. 2010). Esse parâmetro está relacionado diretamente com a produção relativa de espermatozoides em espécies de roedores (GOMENDIO et al. 2006). Nesse estudo, o IGS apresentou uma pequena redução nos animais do grupo que recebeu 100mg/kg do extrato aquoso de *P. niruri* devido ao aumento proporcional dos pesos corporal e testicular.

No presente estudo, não foi verificada diferença significativa no diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero nos testículos dos ratos tratados. No entanto, Mirhoseini et al. (2012) observaram que houve diminuição significativa nos diâmetros e alturas dos túbulos seminíferos após 35 dias de tratamento com o extrato aquoso (200

mg/kg) da flor do cártamo (*Carthamus tinctorius L.*). Já no trabalho realizado por Hardani et al. (2015), houve tendência de aumento na altura do epitélio e diâmetro tubular em ratos tratados com extrato aquoso de aipo (*Apium graveolens L.*) nas concentrações de 100 e 200 mg/kg. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo com *P. niruri*.

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na espermatogênese (MONSEES et al. 2000), pois possui muitas funções e as desempenha simultaneamente, dando suporte ao epitélio, sustentação e manutenção das células germinativas, fagocitose e eliminação de debris celulares liberados pelas espermátides alongadas durante a espermiogênese (RUSSELL et al. 1990; RUSSELL e GRISWOLD, 1993).

Nesse estudo, a população de células de Sertoli não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, no entanto, foi observado um aumento desse parâmetro acompanhado de aumento também na produção espermática diária por testículo e na produção espermática diária por grama de testículo, semelhantes aos achados encontrados por Orth et al. (1988), que descreveu que o número de células de Sertoli determina a produção espermática diária nos indivíduos sexualmente maduros.

De acordo com Couto (2005) e Gilberto et al. (2005), *P. niruri* contém alcalóides, flavonóides e saponinas (NAKWETI et al. 2013) que podem influenciar no testículo de rato. Gauthaman et al. (2002) mostraram que a saponina tem efeito estimulador sobre produção de andrógenos como a testosterona. As células de Leydig sintetizam os andrógenos testosterona e hidrotosterona, a testosterona é o principal hormônio responsável pela espermatogênese e a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas acessórias e do epidídimo. A síntese de testosterona é controlada por hormônios produzidos pela hipófise, como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), (GOYAL et al. 1999; COLLETA E CARVALHO, 2005).

Em trabalho realizado por Asare et al. (2013), foi observada redução nos níveis de testosterona em camundongos tratados com o extrato aquoso (50mg/kg e 500 mg/kg) da folha do *Phyllanthus niruri* durante 90 dias de tratamento, mas não foi estatisticamente significativo. No presente estudo, os níveis de testosterona chegaram a triplicar nos grupos tratados com o extrato aquoso da planta inteira de *Phyllanthus niruri*, embora não tenha sido estatisticamente significativo, diferenciando assim dos achados encontrados por Asare et al. (2013). Da mesma maneira que Asare et al. e Oyelowo et

al. (2011) também observaram queda no níveis séricos de testosterona em animais tratados com o extrato aquoso (400 mg/kg) de *Trichilia monadelpha*.

Em estudo do efeito antifertilidade de *Martynia annua* L., utilizando extrato etanólico com doses de 50, 100 e 200 mg/kg em camundongos por 60 dias, Mali et al. (2002), observaram que o nível de testosterona sérica também sofreu diminuição significativa e atribui esse fato a redução nos danos causados nos testículos. Estes supõem que a diminuição do LH pela indução do extrato tenha suprimido tal hormônio e de forma secundária ter provocado disfunção nas células de Leydig e essas por sua vez reduziram a produção de testosterona.

No presente trabalho observou-se que o diâmetro e volume das células de Leydig apresentaram diferenças significativas, porém a população de células aumentou significativamente, o que sugere que o extrato atua estimulando a síntese do hormônio testosterona e aumento no número de tais células responsáveis pela secreção da testosterona.

O uso de chás ou infusos podem promover toxicidade em órgãos vitais como fígado e rim, Makoshi et al. (2013), informaram que a dose letal para o extrato aquoso de *P. niruri* provavelmente é superior a 2000 mg/kg, pois em seu experimento foram feitos testes com 500, 1000 e 2000 mg/kg e nenhum animal morreu pela toxicidade. No presente estudo foram feitas análises histopatológicas no fígado e rim e foram visualizadas poucas alterações. Contudo, não houve lesões que impossibilitassem o desempenho normal dos órgãos analisados.

Outro órgão que também sofreu influencia do extrato aquoso de *P. niruri* foi à próstata que não apresentou diferença significativa, porém apresentou tendência de aumento na altura do epitélio prostático e no volume do epitélio prostático, lúmen e estroma na dosagem de 500mg/kg do extrato aquoso.

7. CONCLUSÕES

1. O peso do epidídimo e glândula seminal foram influenciados positivamente pela administração do extrato aquoso de *P. niruri* na dose de 100mg.Kg⁻¹.
2. A dose 100mg.Kg⁻¹ *P. niruri* exerceu efeito positivo sobre o volume do compartimento intersticial, população de células de Leydig e consequentemente elevação nos níveis de testosterona.
3. O extrato aquoso de *P. niruri* possui influência positiva sobre a esteroidogênese de ratos machos adultos embora tenha ocorrido influência negativa sobre volume médio das células.
4. Parâmetros testiculares diretamente relacionados com a produção espermática não foram influenciados pelo extrato aquoso de *P. niruri* nas doses administradas.
5. As análises histopatológicas testiculares, prostáticas, hepáticas e renais das doses de 100 e 500mg/kg do extrato aquoso de *P. niruri* não revelaram efeito tóxico sobre o parênquima destes órgãos.

REFERENCIAS

- ADEEKO, A.O e DADA, O.A (1998). Chloroquine reduces the fertility capacity of epididymal sperm in rats. **Afri J Med Med Sci**, v. 27, n. 1-2, p. 63-68, 1998.
- ASARE et al. Male rat hormone imbalance, testicular changes and toxicity associated with aqueous leaf extract of an antimalarial plant: *Phyllanthus niruri*. **Pharmaceutical Biology**, Early Online: 1–9. 2013.
- BAGALKOTKAR, G.S. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 12, p. 1559-70, 2006.
- BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. **Conservation and Research Center**, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA. 2004.
- CIMANGA, R.K. et al. In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri*. **J Ethnopharmacol**, v. 95, n. 23, p. 399-404, 2004.
- COUTO, A. G. **Desenvolvimento tecnológico de comprimidos a partir de granulados do produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* e o controle da qualidade da matéria-prima vegetal a partir do seu cultivo.** (Tese - Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2005.
- CHEN XW, et al. Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. **Chem Biol Interact**. v. 15 n. 192(3), p. 161–76, 2011.
- DHAR, M. L., et al. Screening of indian plants for biological activity: part i. **Indian J. Exp. Biol**. v. 6 p. 232–247, 1968.
- FRANCO, E. A. P. **A diversidade etnobotânica no quilombo olho d'água dos Pires, Esperantina, Piauí, Brasil**, 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento e meio ambiente) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2005.
- GAUTHAMAN K, ADAIKAN PG, PRASAD RN. Aphrodisiac properties of Tribulus Terrestris extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. **Life Sci**. v. 7, n.1, p. 1385–1396.
- GILBERTO, B. FERREIRA, J.L.P., ALVES, L. F. **Monografias de Plantas Mediciniais Brasileiras e Aclimatadas**. Curitiba, ABIFITO, 2005.
- GOYAL, H. O. et al. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of the testis fluid. **Anat Rec**. v. 1, n. 254 p. 508-520, 1999.

HARDANI A, et al. Effects of aqueous extract of celery (*Apium graveolens* L.) leaves on spermatogenesis in healthy male rats. **Avicenna J Phytomed.** v. 5, n. 2, p. 111, 2015.

MACIEL et al., **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares** Quim. Nova, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALI PC, ANSARI AS, CHATURVEDI M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. **J Ethnopharmacol** v. 82 p. 61–7, 2002.

MATOS, F. J.A. **Introdução a fitoquímica industrial.** Fortaleza. Universidade Federal do Ceará, 1997.

MARKOM ET AL 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology** v.52 p. 487–496, 2007.

MEISEL, M.L., WINTERHOFF, H., JAKAT, F.W. (). Tyrosine inhibits the steroid genesis in leydig cells in vitro. **Life science.** v. 53, p. 7784, 1993.

NAKWETI, R. K.; et al. Phytochemical analysis of *Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae) extracts collected in four geographical areas in the Democratic Republic of the Congo. **African Journal of Plant Science.** v. 7, n. 1, p. 9-20, 2013.

OYELOWO OT, BOLARINWA OL, MORENIKEJI OA. Assessment of sperm indices and testosterone level on the effect of *Trichilia monadelph*a extract in male albino rats. **Afr J Pharm Pharmacol** v. 5, p. 1956–8, 2011.

PARHIZKAR S, ZULKIFLI SB, DOLLAH MA. Testicular morphology of male rats exposed to *Phaleria macrocarpa* (Mahkota dewa) aqueous extract. **Iran J Basic Med Sci.** v. 17, p. 384-390, 2014.

PHARMACIA BRASILEIRA. **Saúde elabora relação de plantas medicinais de interesse ao SUS.** Ano XII, n. 70, p. 77-78, 2009.

SHAMSA F, et al. A Quantitative investigation on some toxic and non-toxic metals in popular medicinal herbs in Iranian market. **Iranian J Pharm Res.** v. 2, p. 95-99, 2009.

SILVA & SALES. *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** V. 21, n.1, p. 79-98, 2007.

SIMONS, I.E., R.S.H., BERMAN, E. Environ. **Health Perspective.** v. 103, p. 67-71, 1995.

SILVA JÚNIOR, V.A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development,** v.45, p.1-10, 2006.

SOH et al. 2009. Antiplasmodial activity of various parts of *Phyllanthus niruri* according to its geographical distribution. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.** v. 3, n. 12. p. 598-601. 2009.

SUBEKI, S. Antibabesial and antiplasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod.** v. 68 n. 4, p. 537-539, 2005.

THIPPESWAMY, A. H. M. et al. Protective role of *Phyllanthus niruri* extract in doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. **Indian J. Pharmacol.** v. 43, n. 1, p. 31-35. 2011.

VARGAS, R. A. 2013. **Efeito crônico da administração de esteróide anabólico androgênico na próstata de ratos** Dissertação. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2013.

WEBSTER, G.L. A monographic Study of the West Indian species of the *Phyllanthus* L. **Journal of the Arnold Arboretum** v. 37 n. 2, p. 91-122, p. 217-256, p. 341-357. 1956.

WEBSTER, G.L. Three new sections and a new subgenus of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Novon** v. 12 n. 2, p. 290-298. 2002a

WEBSTER, G.L. A synopsis of the Brazilian *taxa* of *Phyllanthus* section *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Lundelia** v. 5 n. 5 p. 1-26. 2002b.

CAPÍTULO II

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Phyllanthus niruri* L. (QUEBRA-PEDRA) SOBRE OS TESTÍCULOS, PRÓSTATA, RINS E FÍGADO EM RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HISTOMORFOMÉTRICA E HORMONAL

RESUMO

Phyllanthus niruri é uma erva daninha, tropical, conhecida como quebra pedra. É muito utilizada na medicina popular por apresentar propriedades químicas que atuam em doenças como urolitíases, hipertensão, efeito antimalária, porém não há muitos trabalhos avaliando sua atividade no sistema reprodutor masculino. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanólico em diferentes doses de *P. niruri*, sobre o testículo, próstata, fígado e rins em ratos wistar adultos através da histopatologia e histomorfometria. A planta foi coletada, seca e triturada. O extrato foi feito por imersão de espécimes inteiros em recipiente contendo etanol PA Merk©. Foram utilizados 18 ratos distribuídos em três grupos: grupo 1 controle recebeu óleo de gergelim. Grupo 2 recebeu 100 mg/kg do extrato etanólico e o grupo 3 recebeu 500mg/kg do extrato etanólico de acordo com o peso corporal de cada animal. O extrato etanólico foi administrado por gavagem por 30 dias consecutivos e posteriormente foram eutanasiados e analisados quanto a morfometria testicular e prostática e à toxicidade nos rins e fígado. Foram visualizadas reduções no peso corporal, testicular e prostático dos animais, o nível de testosterona não sofreu redução nos animais tratados quando comparado aos animais do grupo controle. A redução na altura do epitélio prostático e no peso dos rins sugerem que o extrato etanólico causou redução nesses parâmetros. O extrato etanólico não é indicado para ingestão pois provoca alterações importantes no fígado e rins.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Quebra-Pedra. Extrato Etanólico. Morfometria Testicular. Próstata.

ABSTRACT

Phyllanthus niruri is a tropical weed, known as stone breaker. It is widely used in folk medicine due its chemical properties against many diseases, as urolithiasis, hypertension and malaria. However, its activity on the male reproductive system is poorly investigated. The aim of this study is to evaluate the effect of ethanolic extract of *P. niruri* in different concentrations on the testis, prostate, liver and kidney in adult Wistar rats through histopathology and histomorphometry. The plant was collected, dried and crushed. The extract was produced by soaking whole specimens in ethanol PA Merk©. Eighteen rats were divided into three groups: Group 1 (Control) received sesame oil, Group 2 received 100 mg/kg of the ethanolic extract and Group 3 received 500mg/kg of the ethanolic extract. The animals were treated by gavage for 30 days, when they were euthanized. Prostate and testicular morphology and kidney and liver toxicity were analyzed. Body, testicular and prostate weight reduced, but serum testosterone levels did not differ from control group. The treatment with the ethanolic extract also decreased the height of the prostatic epithelium and weight of the kidneys. The ethanolic extract is not suitable for consumption because it causes significant changes in the liver and kidneys.

Key-words: Medicinal Plants. Stone Breaker. Testicular Morphometry. Reproduction. Prostate.

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, as plantas medicinais tem sido opção de tratamento a diversas doenças, principalmente em países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos a indústria farmacêutica é bastante expressiva, apesar disso, ainda é grande o número de pessoas que utilizam as plantas medicinais como recurso terapêutico (BRANDAO et al., 2010; CALIXTO, 2000).

Diariamente é possível notar o apelo da mídia para o consumo de produtos de fonte natural, com o argumento de que as plantas são utilizadas há milênios e por isso são seguras para a população em qualquer lugar do mundo. Porém, é importante esclarecer que a forma de extração ou aplicação dessas plantas, pode acarretar em toxicidade para o indivíduo, sendo mais comuns os efeitos adversos relacionados a adulterações a preparação do extrato e ação sinérgica da planta com outras drogas, sendo em muitos casos, problema de saúde pública (VEIGA JR et al. 2005).

No Brasil, a legislação regula os critérios de qualidade para esses medicamentos (BRASIL, 2010a; 2010b), da mesma forma como ocorrem em muitos países europeus, apoiados em normativas da Organização Mundial da Saúde (COUTO et al., 2013b).

Dentre os espécimes medicinais brasileiros, *Phyllanthus niruri*, conhecido como “Quebra-pedra” se destaca por ser de ampla utilização e ocorrência no país. Pertence a família *Phyllanthaceae*, gênero *Phyllanthus* que possui mais de 600 espécimes, dentre as quais, muitas crescem no Brasil (BAGALKOTKAR et al., 2006; CALIXTO et al., 1998).

Phyllanthus niruri L. é considerado uma planta medicinal promissora para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, e está incluso no RENISUS Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), baseados em evidências farmacológicas relacionadas ao seu uso popular, além de dados fornecidos por estudos fitoquímicos e botânicos (BAGALKOTKAR et al., 2006; CALIXTO et al., 1998; COUTO et al., 2013b; BARROS et al., 2006; MOREIRA et al., 2013; PHARMACIA BRASILEIRA, 2009).

P. niruri apresenta diterpenoides, triterpenoides, alcalóides, taninos, ellagitaninos, flavanóides, lignanas, em sua composição química, a porcentagem de cada composto depende do tipo de extração que foi realizada. Esses compostos

químicos atuam com função antihepatotóxica, antihipertensiva, antihepatite B, antidiabética, diurética e urolitíases (BAGALKOTKAR et al., 2006; BARROS et al., 2003).

Diante do exposto, o objetivo desse artigo é investigar e avaliar os efeitos do extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* L. sobre os testículos, próstata, rins e fígado em ratos Wistar adultos através de avaliação histopatológica e histomorfométrica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PLANTA

Exemplares de *P. niruri* foram coletadas em Cruz de Rebouças, Igarassu, PE. A identificação taxonômica foi realizada no herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, registrada e tombada sob o número de registro 51.757.

2.2 EXTRAÇÃO DA PLANTA

Espécimes inteiros da planta foram coletados, secados em estufa a 50 ° C, pesados em balança comercial e triturados com auxílio de um liquidificador até ficarem na consistência de pó.

A extração etanólica foi realizada por imersão das plantas inteiras em recipiente contendo etanol P.A. Merk®, na proporção de (2:1), por 72h (MATOS, 1997). O material resultante foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rota-evaporador sob pressão reduzida, a 45 °C e com 120 rpm (rotações por minuto), e armazenado em freezer a -20 °C até o uso.

Para administração orogástrica (gavagem) nos ratos, o extrato foi pesado, diluído em óleo de gergelim e as doses foram ajustadas de acordo com o peso individual dos animais, nas concentrações de 100 mg e 500 mg.

2.3 MOD/ELO ANIMAL

Foram utilizados 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), oriundos do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal DMFA/UFRPE, os quais foram mantidos a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo circadiano. Os animais foram alimentados com ração industrial peletizada, em níveis nutricionais adequados. Água e comida foram oferecidos *ad libitum* durante todo o experimento.

Esse projeto foi aprovado pela comissão de ética animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco com o processo nº 23082.015149/2014 e licença 132/2014.

2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos tinham de 4-6 meses de idade e pesavam entre 300 e 450 gramas. Foram formados 3 grupos experimentais de modo aleatório G1, G2 e G3.

Grupo G1 n=6: Animais controle tratados com óleo de gergelim.

Grupo G2 n=6: Animais tratados com 100 mg/Kg do extrato etanólico de *P. niruri*.

Grupo G3 n=6: Animais tratados com 500 mg/kg do extrato etanólico de *P. niruri*.

Os animais receberam o extrato etanólico de *P. niruri* por meio de gavagem por 30 dias consecutivos. Semanalmente foram pesados e suas doses ajustadas ao peso correspondente.

2.5 EUTANASIA E COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE

Ao final dos 30 dias de experimento os animais foram eutanasiados com aprofundamento do anestésico por injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 25mg/kg associada à xilazina 10mg/kg na mesma seringa e aprofundadas com tiopental (FANTONI; CORTOPASSI, 1994). Posteriormente foi realizada coleta de sangue total por punção no seio venoso, centrifugação e acondicionamento de duas alíquotas de 1 ml de plasma sangüíneo, para posterior dosagem de testosterona. Após coleta de sangue foi realizada perfusão intracardíaca com NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L; AKZO ORGANON TEKNIKA) e nitroprussiato de sódio (100mg/L; SIGMA). Em seguida, os animais foram perfundidos com glutaraldeído a 4%, em tampão fosfato

de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos. Após a perfusão foram removidos e pesados: testículos, epidídimos, próstata, glândula seminal, rins, fígado, pulmão, coração, baço. Foram avaliados suas alterações decorrentes do uso dos extratos de *P. niruri* em relação à toxicidade no fígado, rins, processo espermatogênico e órgãos andrógeno dependentes.

2.6 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

Após a perfusão os testículos, epidídimos e próstata foram refixados na mesma solução utilizada na perfusão por duas horas. De cada animal, um fragmento da próstata e um testículo foram utilizados para as análises microscópicas. Os testículos e próstata foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura.

Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA), antes disso permaneceram imersos em tampão fosfato por 2 horas, sendo posteriormente desidratados em séries crescentes de alcoóis e incluídos na resina plástica. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados morfológicamente e morfometricamente.

2.7 ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

O índice gonadossomático foi calculado através da soma do peso de ambos os testículos, dividido pelo peso corporal, sendo referenciado em porcentagem (BARBOSA et al. 2012).

2.8 AVALIAÇÃO QUALITATIVA, QUANTITATIVA E HISTOPATOLÓGICA TESTICULAR

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidas em aumento de 100X usando um sistema de captura de imagem acoplado a um microscópio óptico Olympus BX-51. O diâmetro tubular médio para cada rato foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos

aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. Os valores encontrados foram resultantes da média de duas retas diametralmente opostas.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando um sistema de captura de imagem onde foi inserida uma grátula micrométrica com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo expresso em metros foi estimado a partir da razão do volume absoluto ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo (VATS) por R^2 (onde R é o diâmetro tubular/2) e o valor de π : $CT = VATS/\pi R^2$ (ATTAL e COUROT, 1963).

Foi realizada a contagem de espermatogônias, espermatócitos I em estágio de pré-leptóteno e paquíteno, espermatídes arredondadas e nucléolos de células de Sertoli em cinco túbulos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero. A população de células de Sertoli foi obtida através da contagem do número de células com o nucléolo visível. Após isso, foi realizada a correção do número obtido utilizando a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962), conforme segue:

$$Número\ corrigido = contagem\ obtida \times \frac{Espessura\ do\ corte}{Espessura\ do\ corte + \sqrt{\left(\frac{DM^2}{2}\right) - \left(\frac{DM^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nucleolar médio (DM) representa a média dos diâmetros de 05 nucléolos de células de Sertoli para cada animal dos grupos. A população foi estabelecida através do resultado da multiplicação do número corrigido pelo comprimento total dos túbulos seminíferos em micrômetros (μm) e dividido pela espessura do corte.

A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Júnior et al. (2006): $PED = N^{\circ}$ total de

células de Sertoli por testículo X a proporção de espermatídes redondas no estágio VII x estágio VII com frequência relativa / duração do estágio (dias).

As células de Leydig foram analisadas quanto a sua população, volume, que foi feita através de proporção onde foram contados 1000 pontos entre citoplasma e núcleo com o auxílio do graticula e o diâmetro do núcleo, foi obtido através da medida de 30 diâmetros por animal (NEVES, 2001).

O diâmetro nuclear das células de Leydig foi obtido através da média de duas retas diametralmente opostas em aumento de 1000x. Foram mensurados 30 núcleos por animal e foi aplicada a fórmula do volume da esfera ($4/3\pi R^3$) para a obtenção do volume individual da célula.

A proporção volumétrica de núcleo/citoplasma foi realizada através da contagem de 1000 pontos entre citoplasma e núcleo, utilizando um retículo com 441 intersecções no aumento de 1000x. A partir dessa proporção foi calculado o volume citoplasmático e o volume celular. O volume citoplasmático foi calculado pela multiplicação da porcentagem de citoplasma pelo volume nuclear, e dividido pela porcentagem nuclear. O volume individual da célula de Leydig foi estimado através da soma entre os valores do volume nuclear e volume citoplasmático (MORAIS et al., 2014).

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig por testículo, obteve-se a população dessas células por testículo. Em seguida, esse valor foi dividido pelo peso líquido para obtenção da população por grama de testículo.

2.9 PROCESSAMENTO DE MATERIAL PARA HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos dos rins, fígado, pulmão, baço e coração foram confeccionados em lâminas histológicas através de clivagem, e processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.), segundo metodologia descrita por Behmer, Tolosa e Freitas Neto (1976). As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico. Todo processamento para microscopia óptica foi realizado na Área

de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária e na Área de Histologia do DMFA/ UFRPE.

2.9.1 TESTOSTERONA SÉRICA

De cada animal foram obtidas amostras sanguíneas, por meio de punção cardíaca. O sangue obtido foi envasado em tubos de ensaio contendo anticoagulante e posteriormente foi levado a centrifuga por quinze minutos a 2500 rpm. Após a precipitação das células sanguíneas, o soro sobrenadante foi colhido por micropipetas, armazenado em eppendorff e guardado em freezer até a realização das dosagens de testosterona. A dosagem foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm.

3 MORFOMETRIA PROSTÁTICA

Os blocos foram confeccionados em resina plástica e a altura do epitélio acinar foi medida em cortes a 4µm e corados por azul de toluidina com 1% de borado de sódio. Para tanto foi considerado a distância linear, medida em micrometros, entre superfície luminal e sua membrana basal. Foi utilizado a função “straight line” do software ImageJ versão 1,48 (NIH, Bethesda, Maryland, EUA) para esta análise. A média de cada animal foi calculada após 250 medições com aumento de 100X, adaptada de Vargas (2013).

3.1 PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DA PRÓSTATA

As densidades de área do lúmen acinar, epitélio e do estroma foram calculadas com auxílio do software ImageJ. Em cada campo histológico, foi aplicado uma grade de 108 pontos e os pontos incidentes sobre o lúmen, epitélio e estroma foram contados e expressos em porcentagem. Para cada animal, a média foi determinada em 25 campos com aumento de 400X, adaptado de Vargas (2013).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *GRAPHPAD PRISMA 5*. Foram realizados os testes ANOVA e pos hoc de Tukey e os dados representados como média e desvio padrão. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DO PESO CORPORAL, EPIDÍDIMO, PRÓSTATA, VESÍCULA, TESTÍCULOS, ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS), FÍGADO E RINS

De acordo com a Figura 1, Tabela 1 não houve diferença significativa com relação ao peso corporal dos animais nos grupos analisados ($p = 0,1837$). Também não foi verificada diferença estatística no peso testicular dos grupos estudados ($p = 0,7343$), embora em ambos seja possível verificar uma tendência a redução de 7% e 3% respectivamente.

O índice gonadossomático não apresentou diferença significativa nos animais tratados com 100 mg/kg e 500 mg/kg em relação ao grupo controle ($p = 0,7271$), embora seja possível notar uma tendência de aumento de 12,5% nas duas dosagens.

Não foi observada diferença estatística no peso da próstata ($p = 0,9263$) entre os grupos estudados. Assim como na próstata, na glândula seminal ($p = 0,7823$) e no epidídimo ($p = 0,1054$) não foram visualizadas diferenças significativas nos tratamentos.

O peso do fígado Figura 2, Tabela 1, não apresentou diferença significativa ($p = 0,2742$), o peso dos rins apresentou uma redução significativa de 11% e 15% nas doses de 100 mg/kg e 500 mg/kg ($p = 0,0313$).

Tabela 1. Parâmetros biométricos de ratos Wistar adultos do grupo controle e tratados com extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

	Grupos experimentais		
	Controle	100 mg/Kg	500 mg/Kg
Peso corporal (g)	379,7 ± 27,24	370,0 ± 29,63	351,7 ± 17,17
Testículo (g)	1,49 ± 0,18	1,48 ± 0,09	1,44 ± 0,08
Epidídimo(g)	0,73 ± 0,05	0,82 ± 0,08	0,75 ± 0,08
IGS (%)	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,0004	0,009 ± 0,0005
Próstata (g)	0,86 ± 0,21	0,90 ± 0,19	0,87 ± 0,16
Glândula Seminal (g)	1,68 ± 0,46	1,79 ± 0,39	1,86 ± 0,42
Peso Fígado (g)	10,46± 1,02	10,90± 0,77	9,99± 1,00
Peso Rim (g)	1,38± 0,15 ^a	1,21± 0,13 ^a	1,17± 0,10 ^b

n = Número de animais; IGS (%) = Índice gonadossomático. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

Figura 1 A- Peso Corporal (g), B- Testicular (g) e C- Índice Gonadossomático – IGS (%), D- Epidídimo (g), E- Próstata (g), F- Glândula Seminal (g) de ratos adultos tratados com extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* nas concentrações de 100 mg/kg e 500 mg/kg.

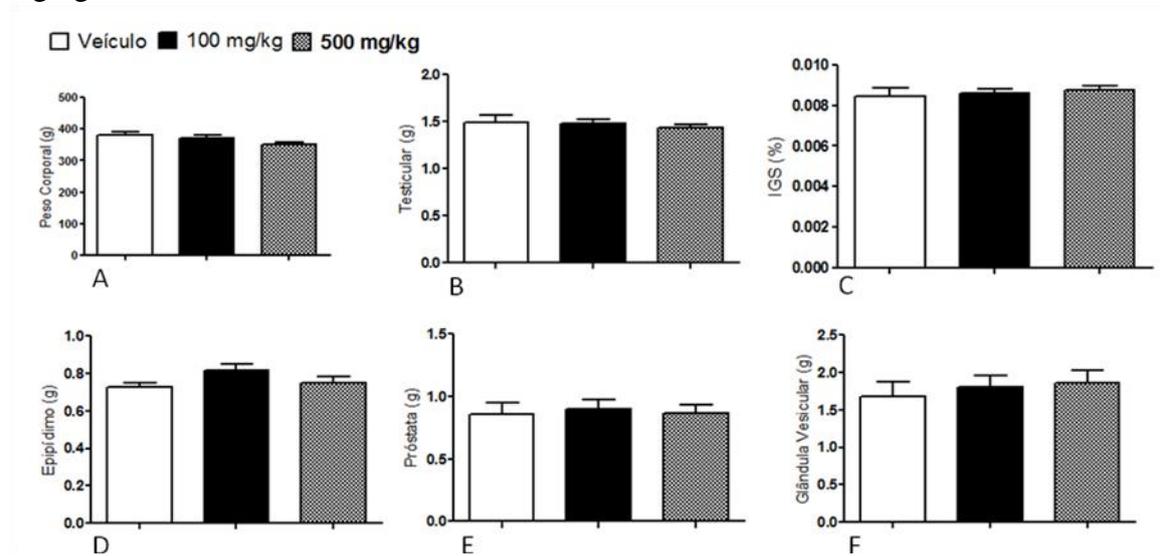
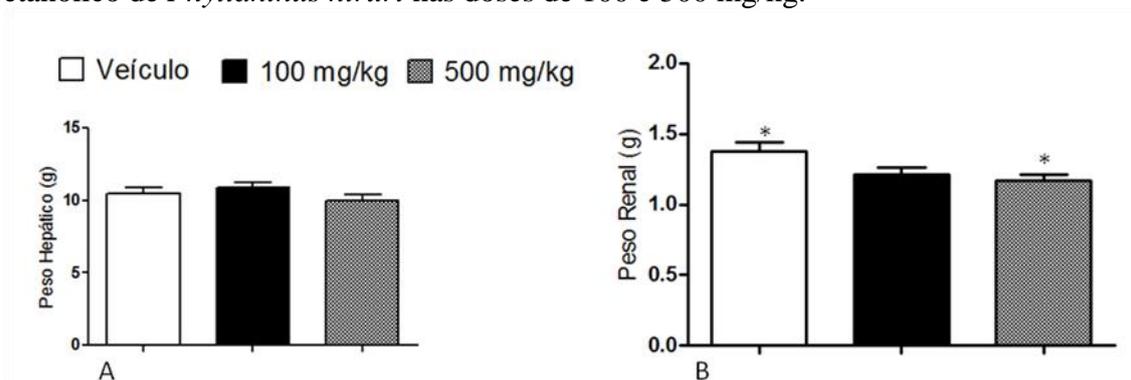


Figura 2 A- Peso Hepático e B Peso Renal de ratos adultos tratados com extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.



5.2 RELAÇÃO VOLUME DO TÚBULO SEMINÍFERO (mL) X VOLUME DO INTERSTÍCIO (mL)

Não houve diferença significativa no volume ocupado pela região tubular ($p=0,9592$) entre os grupos experimentais, Figura 3, Tabela 2.

No volume ocupado pelo interstício, não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém houve uma tendência a redução de (10 %) no grupo de 100 mg/kg e de (20 %) no grupo de 500mg/kg ($p=0,2400$).

Figura 3 A- Volume Tubular (mL) e B- Volume ocupado pelo Interstício (mL) de ratos adultos tratados com extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.

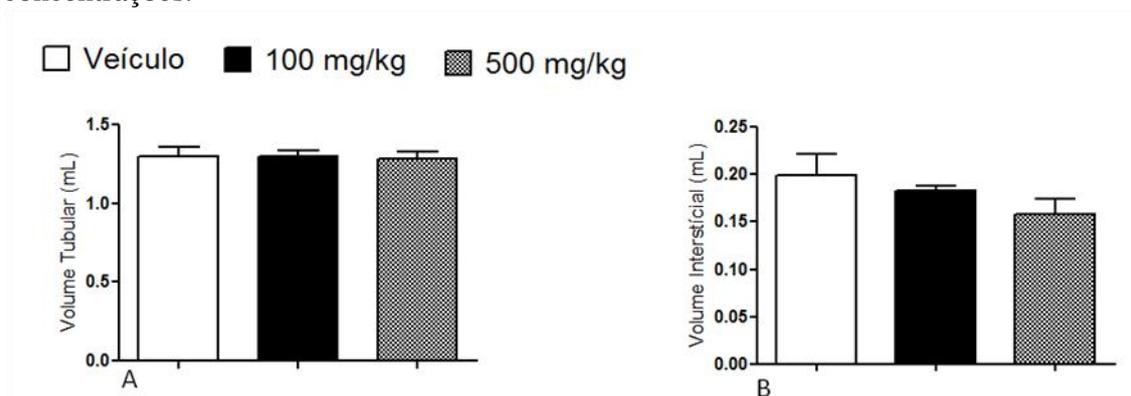


Tabela 2. Volume Tubular (mL) e volume Intersticial (mL) do túbulo seminífero dos animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do extrato etanólico de *Phyllanthus niruri*.

	Grupo Experimental		
	Controle	100 mg/Kg	500 mg/Kg
Volume Tubular (mL)	1,29± 0,15	1,29± 0,08	1,28± 0,11
Volume do Interstício (mL)	0,198± 0,055	0,180± 0,014	0,158± 0,038

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

5.3 COMPARTIMENTO TUBULAR

O diâmetro ($p= 0,1067$) e a altura do epitélio seminífero ($p= 0,0545$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o grupo controle. De acordo com a tabela 3, o comprimento total do túbulo seminífero (μm) não diferiu estatisticamente ($p= 0,2626$), apesar disso esse parâmetro apresentou tendência a redução de 12% e 7% nos grupos tratados com 100 e 500mg/kg, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 5-A).

A população de células de Sertoli não diferiu significativamente entre os grupos experimentais ($p= 0,0655$) (Tabela 3). Contudo, houve tendência a redução nos grupos tratados com extrato na dosagem de 100mg/kg (27,5%) e 500mg/kg (9%) quando comparado ao grupo controle (Figura 5-B).

A produção espermática diária por testículo apresentou tendência a redução de 30 % no grupo 100mg/kg em relação ao grupo controle, embora não tenha sido estatisticamente significativo ($p= 0,1141$) (Tabela 3), (Figura 5-C). Adicionalmente, a produção espermática diária por grama de testículo (Tabela 3) também não apresentou diferença estatística entre os grupos avaliados ($p=0,1042$), (Figura 5-D).

Tabela 3. Diâmetro Tubular e Altura do Epitélio Seminífero de animais dos grupos controle e tratados com as doses de 100 e 500 mg/kg do Extrato Etanólico de *Phyllanthus niruri*.

		Grupos experimentais		
		Controle	100 mg/Kg	500 mg/Kg
Diâmetro tubular (g)		324,2 ± 11,74	347,5 ± 22,04	335,8 ± 17,68
Altura do Epitélio Seminífero (g)		97,69 ± 2,37	101,1 ± 7,96	92,78 ± 4,46
Comprimento Tubular (m)	Total	15,76 ± 2,21	13,81 ± 1,74	14,55 ± 1,98
População de Célula de Sertoli (10 ⁶)		26,6 ± 5,43	19,3 ± 4,00	24,5 ± 5,81
PDE por Testículo (10 ⁶)		4,27 ± 1,05	3,00 ± 0,60	3,90 ± 1,26
PDE/g de Testículo (10 ⁶)		2,77 ± 0,49	2,03 ± 0,42	2,73 ± 0,87

n = Número de animais. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

Figura 4. Diâmetro Tubular e Altura do Epitélio Seminífero de testículo de ratos adultos tratados com extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

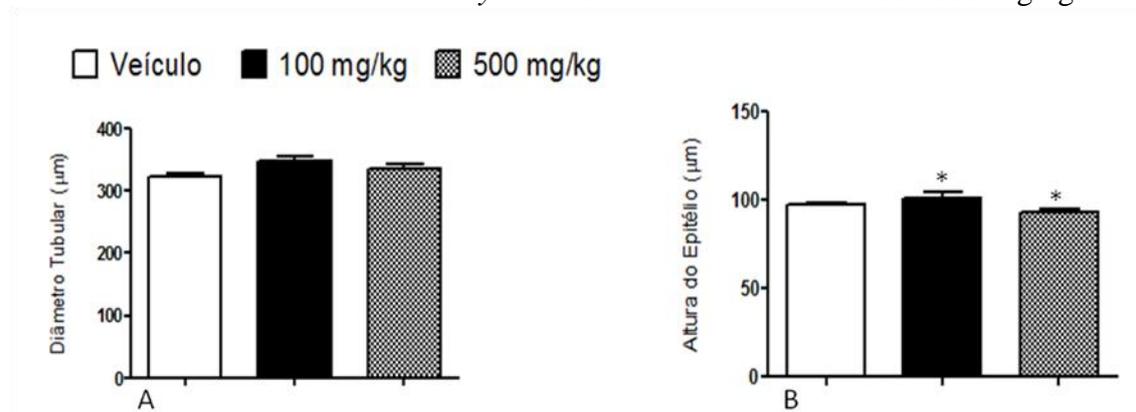
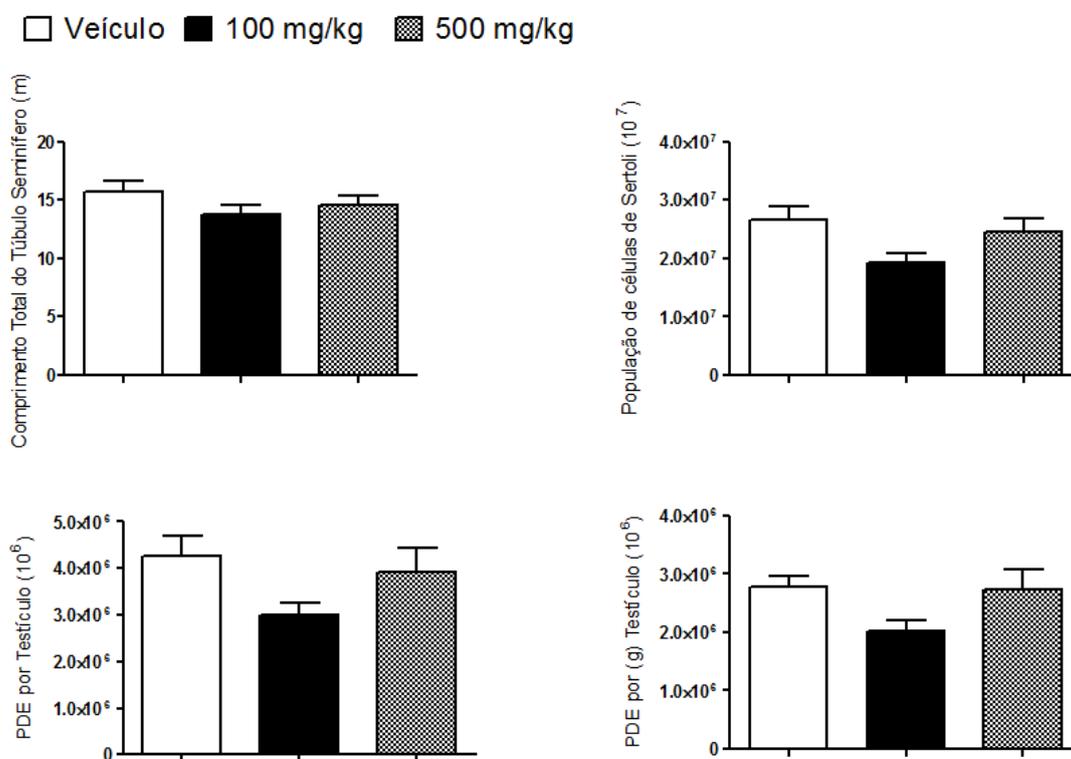


Figura 5 A- Comprimento Total do Túbulo (m), B- População de Células de Sertoli (10^7), C- Produção Espermática Diária (PDE) por testículo (10^6) e Produção Espermática Diária (PDE) por (g) de testículo (10^6) de ratos adultos tratados com extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.



5.4 COMPARTIMENTO INTERSTICIAL (TESTOSTERONA E CÉLULAS DE LEYDIG)

No nível de testosterona sérica não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Apesar disso, os níveis do hormônio tenderam a aumentar após o tratamento, em ambas as concentrações, em comparação com o grupo controle ($p=0,3340$).

O diâmetro nuclear da célula de Leydig diminuiu significativamente nos dois grupos tratados quando comparado ao grupo controle ($p=0,0236$). Com relação ao volume das células de Leydig houve redução significativa entre o grupo controle e 100mg/kg. Da mesma maneira notou-se diferença significativa entre os animais que receberam a dose 100mg/kg e 500mg/kg ($p=0,0026$). A população de células de Leydig apresentou discreta tendência de aumento entre os grupos tratados em relação ao

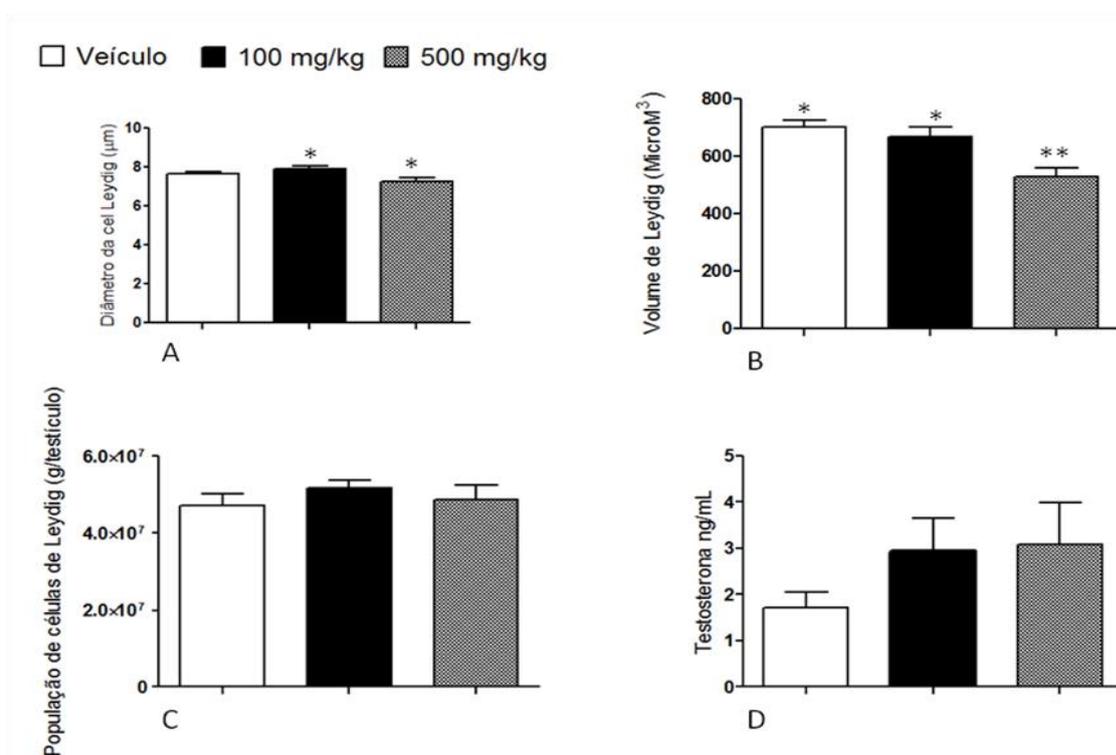
controle de 9% (100mg/kg) e 2% (500mg/kg), embora não tenha sido significativo ($p=0,5761$).

Tabela 4 Níveis de testosterona plasmática (nMol/L), Diâmetro nuclear de células de Leydig (μm), Volume individual de célula de Leydig (μm^3) e População de células de Leydig dos animais dos grupos controle e tratados com 100 e 500 mg/kg de extrato etanólico de *Phyllanthus niruri*.

	Grupos experimentais		
	Controle	100 mg/Kg	500mg/kg
Testosterona (ng/mL)	1,72 ± 0,83	2,94 ± 1,76	3,09 ± 2,21
Diâmetro nuclear de célula de Leydig (μm)	7,70 ± 0,23a	7,92 ± 0,35a	7,29 ± 0,45b
Volume de célula de Leydig (μ^3)	702,3 ± 61,24a	668,1 ± 82,73b	528,8 ± 78,28c
População de célula de Leydig (g/testículo)	47,2 ± 0,70	51,7 ± 0,51	48,6 ± 0,94

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$).

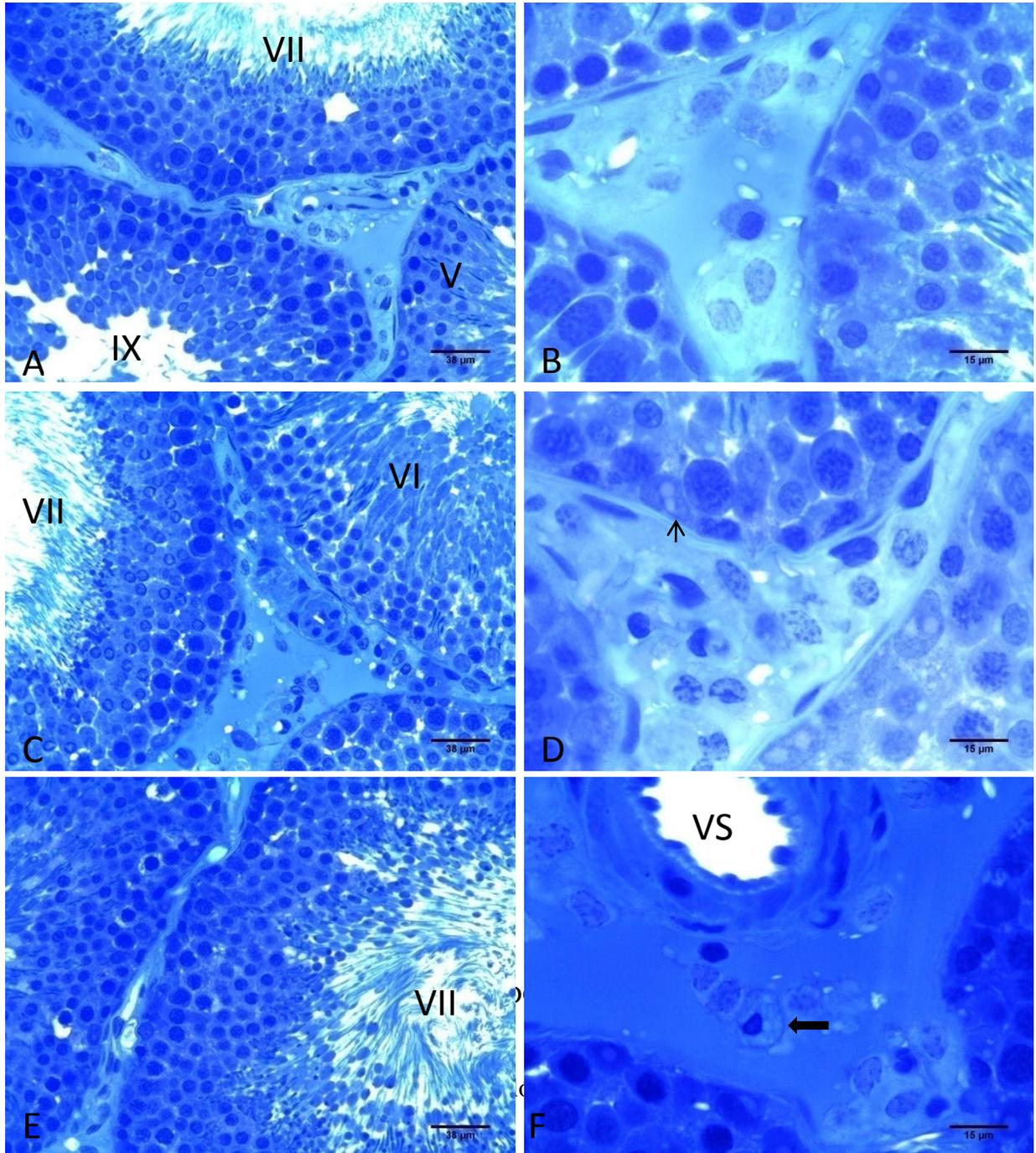
Figura 6. A- Diâmetro Nuclear de Leydig (μm). B- Volume de Leydig (μm^3) C- População de Células de Leydig por testículo (10^6) e D- Níveis Séricos de Testosterona em ratos adultos tratados com extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* em diferentes concentrações.



Na análise histopatológica dos testículos dos animais controle e tratados com controle (óleo de Gergelim) e 100 mg/kg e 500 mg/kg do extrato etanólico de *P. niruri* não foram visualizados alterações significativas no parênquima testicular, de tal forma que diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero foram visibilizados, (Figura 7- A, C e E). Embora na Figura 7D, seja possível notar a presença de vacúolo intranuclear na célula de Sertoli, este achado não foi freqüente nos demais animais.

A região intersticial foi possível notar a presença de células de Leydig e células do conjuntivo, bem preservadas e delimitadas, embora possa ser visibilizada na figura na Figura 7F, a presença de uma célula de Leydig em processo de morte. As figuras A, C e E tem aumento de 400x e B, D e F com aumento de 1000x.

Figura 7 Fotomicrografia comparando o compartimento tubular no estágio 7 da espermatogênese e o compartimento intersticial em ratos do grupo controle (A-B), 100mg/kg de *P. niruri* (C-D), e 500 mg/kg de *P. niruri* (E-F). L- lúmen; Epi – Epitélio; Int – Interstício; VS – vaso sanguíneo; seta preta indica células de sertoli; Seta branca indica célula de sertoli. Aumento 400x e 1000x.



5.5 FÍGADO E RINS

As Tabelas 5 e 6 indicam os achados histopatológicos no fígado e rins de animais que receberam extrato etanólico de *P. niruri*.

Tabela 5 Achados histopatológicos em fígado e rim de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato etanólico *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Achados	Controle	100 mg/kg	500 mg/kg
	Fígado		
Necrose de Coagulação	+	+/+++	+/+++
Vacuolização	-	++	-/+
Congestão	-	-/+++	-/+
Hipertrofia	++	++	+++/>+++
Hiperplasia	++	+/+++	+++/>+++
Dilatação de Capilares Sinusóides	-	++	++
Estreitamento dos Capilares Sinusóides	++	++	+++/>+++
Hepatócitos Grandes/Binucleados	++	+++/>+++	+/+++

Tabela 6 Achados histopatológicos em fígado e rim de ratos Wistar adultos, controle e tratados com extrato etanólico *Phyllanthus niruri* nas doses de 100 e 500 mg/kg.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Achados	Controle	100 mg/kg	500 mg/kg
	Rim		
Vacuolização	+/+++	+/+++/>+++	+++/>+++
Descamação Celular	+	+	
Debris Celular no Lúmen do Túbulo Renal	+	+/+++/>+++	+/+++/>+++
Congestão	+/+++	-	
Atrofia Glomerular	+++/>+++	+/+++/>+++	+++/>+++
Nefrite	-/+	-	
Nefrose	-	++	+/+++
Congestão Corticomedular	++	+/+++/>+++	+/+++/>+++
Glomeronefrite	+/+++	+++/>+++	+/+++/>+++
Hepatócitos Grandes/Binucleados	-	-	-

Figura 8 – Fotomicrografias do parênquima de fígado de ratos tratados ou não com diferentes doses de extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* corados com Hematoxilina Eosina (HE). Figura 8A – Fotomicrografia de parênquima hepático de animais do grupo controle. Notar parênquima hepático e capilares sinusoides, aumento 100x. Figura 8B – Detalhe de parênquima hepático de animais do grupo controle. Observar presença de hepatócitos grandes binucleados (cabeça de seta), aumento 400x. Figura 8C – Fotomicrografia de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 100 mg/kg de *P. niruri*, aumento 100x. Figura 8D – Detalhe de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 100 mg/kg de *P. niruri*. Observar presença de hepatócitos grandes e binucleados (cabeça de seta), dilatação de capilares sinusoides (asterisco), aumento 400x. Figura 8E – Fotomicrografia de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 500 mg/kg de *P. niruri*, aumento 100x. Figura 8F – Detalhe de parênquima hepático de animais do grupo tratado com 500 mg/kg de *P. niruri*. Observar estreitamento de capilares sinusoides (seta azul) e congestão (seta vermelha), aumento 400x.

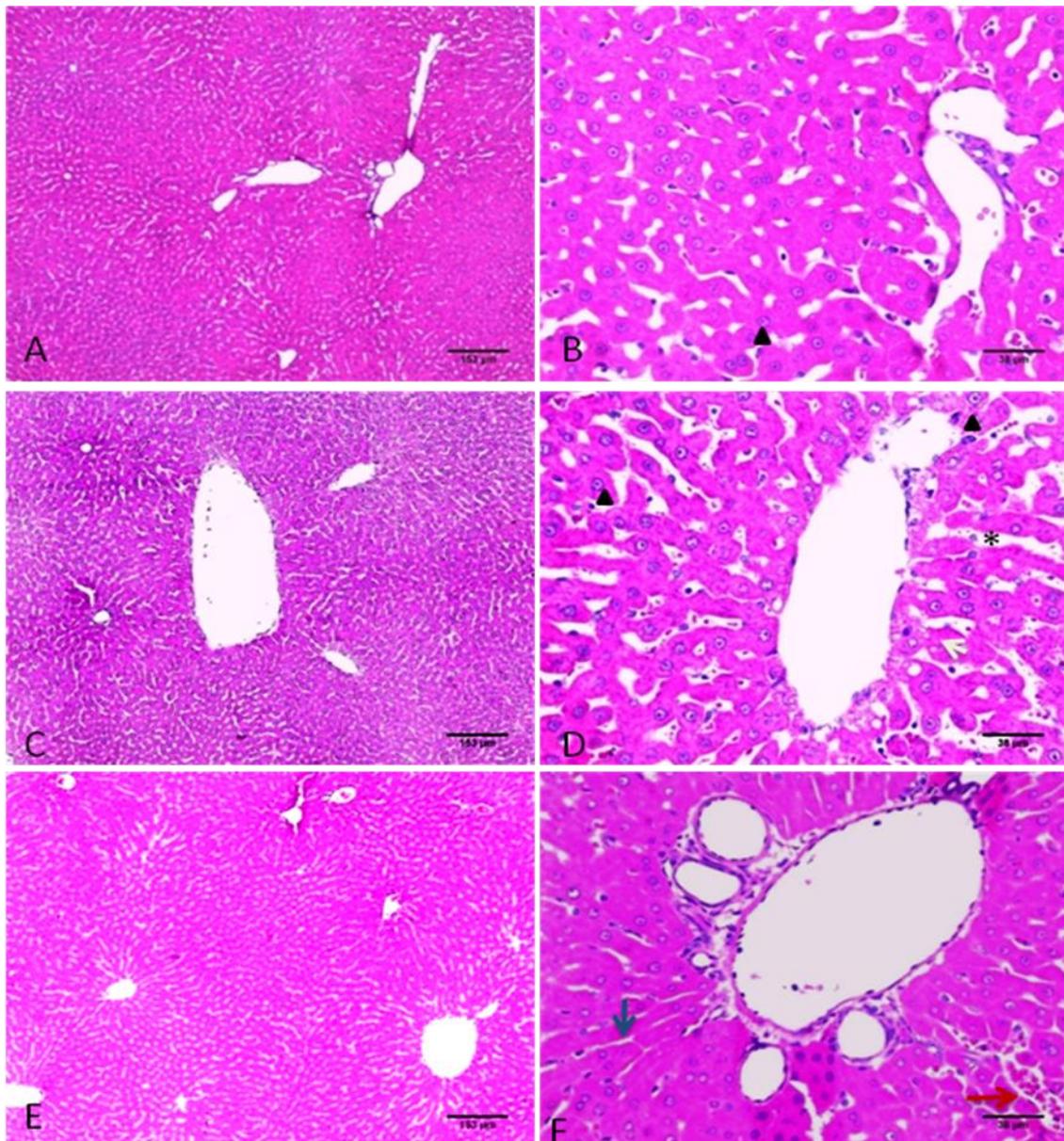
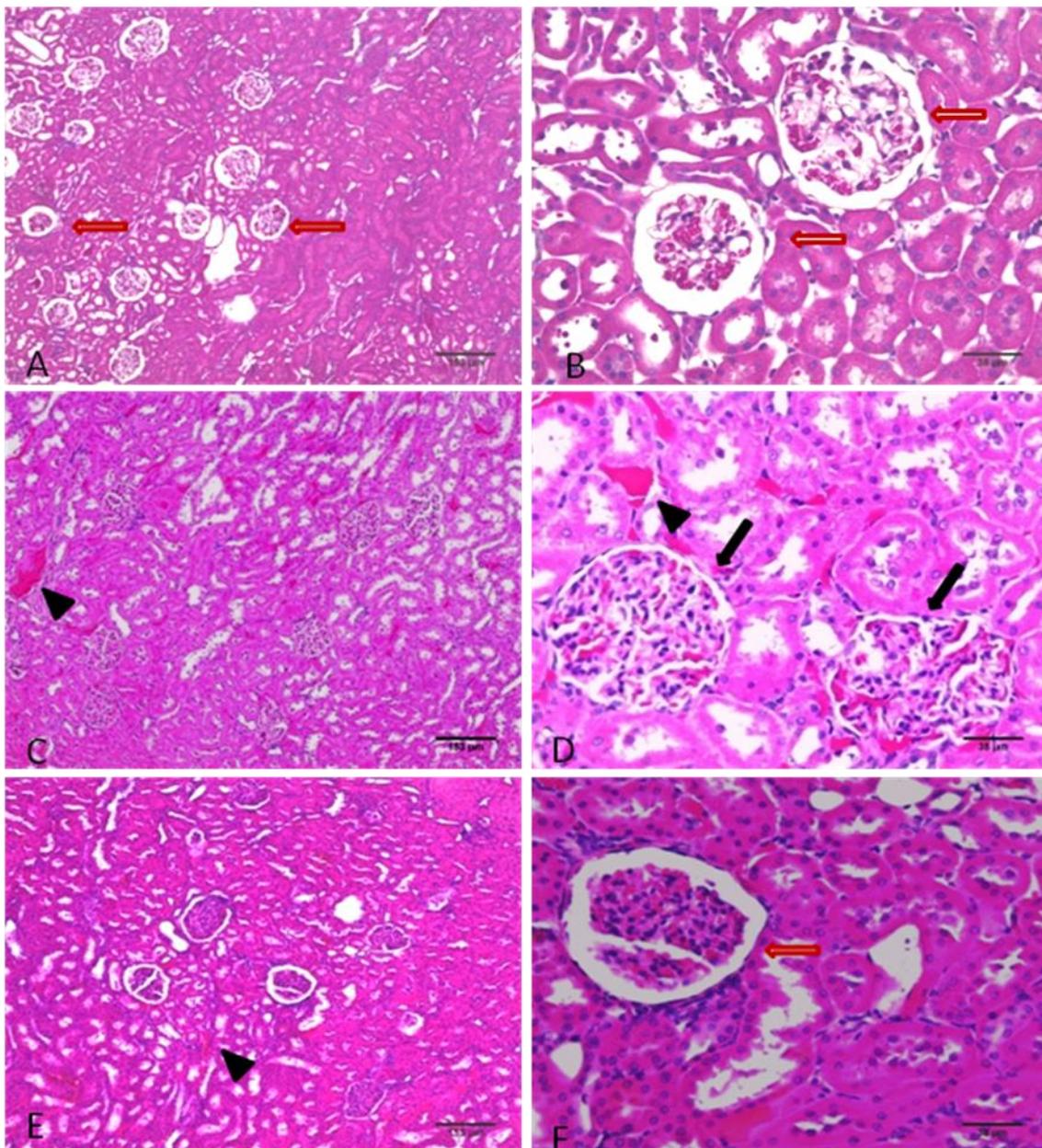


Figura 9 Fotomicrografias do parênquima renal de ratos tratados ou não com diferentes doses de extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* corados com Hematoxilina Eosina (HE). Figura 9A – Fotomicrografia de parênquima renal de animais do grupo controle. Notar atrofia glomerular (seta vermelha), aumento 100x. Figura 9B - Detalhe de glomérulo em atrofia de animais do grupo controle. Observar aumento 400x. Figura 9C - Fotomicrografia de parênquima renal de animais do grupo tratado com 100 mg/kg de *P. niruri* mostrando congestão (cabeça de seta), aumento 100x. Figura 9D – Detalhe de parênquima renal de animais do grupo tratado com 100 mg/kg de *P. niruri*. Observar congestão córticomédular (cabeça de seta) e glomerulonefrite proliferativa (seta preta), aumento 400x. Figura E – Fotomicrografia de parênquima renal de animais do grupo tratado com 500 mg/kg de *P. niruri*. Notar presença de congestão (cabeça de seta), aumento 100x. Figura 9F – Detalhe de parênquima renal de animais do grupo tratado com 500 mg/kg de *P. niruri*. Observar atrofia glomerular (seta vermelha), aumento 400x.



5.6 MORFOMETRIA PROSTÁTICA

A altura do epitélio prostático reduziu significativamente, ($p= 0,0088$) entre o grupo controle e tratado com 100mg/kg (Figura 10 A-D, Tabela 8).

Quanto ao volume do epitélio prostático verificou-se que o tratamento não promoveu alteração significativa entre os grupos tratados ($p=0,8858$). Mas houve uma leve tendência de diminuição de 7% do grupo 100 mg/kg quando comparado aos grupos controle (Figura 10-D, Tabela 8).

Em relação ao volume do estroma não houve diferença entre os grupos tratados com 100mg/kg e 500mg/kg ($p=0,5238$), entretanto a dose de 100 mg/kg apresentou tendência de diminuição de 20%, em relação ao grupo controle. Por sua vez no parâmetro de volume do lúmen também não houve diferença significativa entre os grupos analisados, contudo foi verificado tendência de aumento de 19% no grupo tratado com 100 mg/kg em relação ao grupo controle (Figura 10-C e D, Tabela 8).

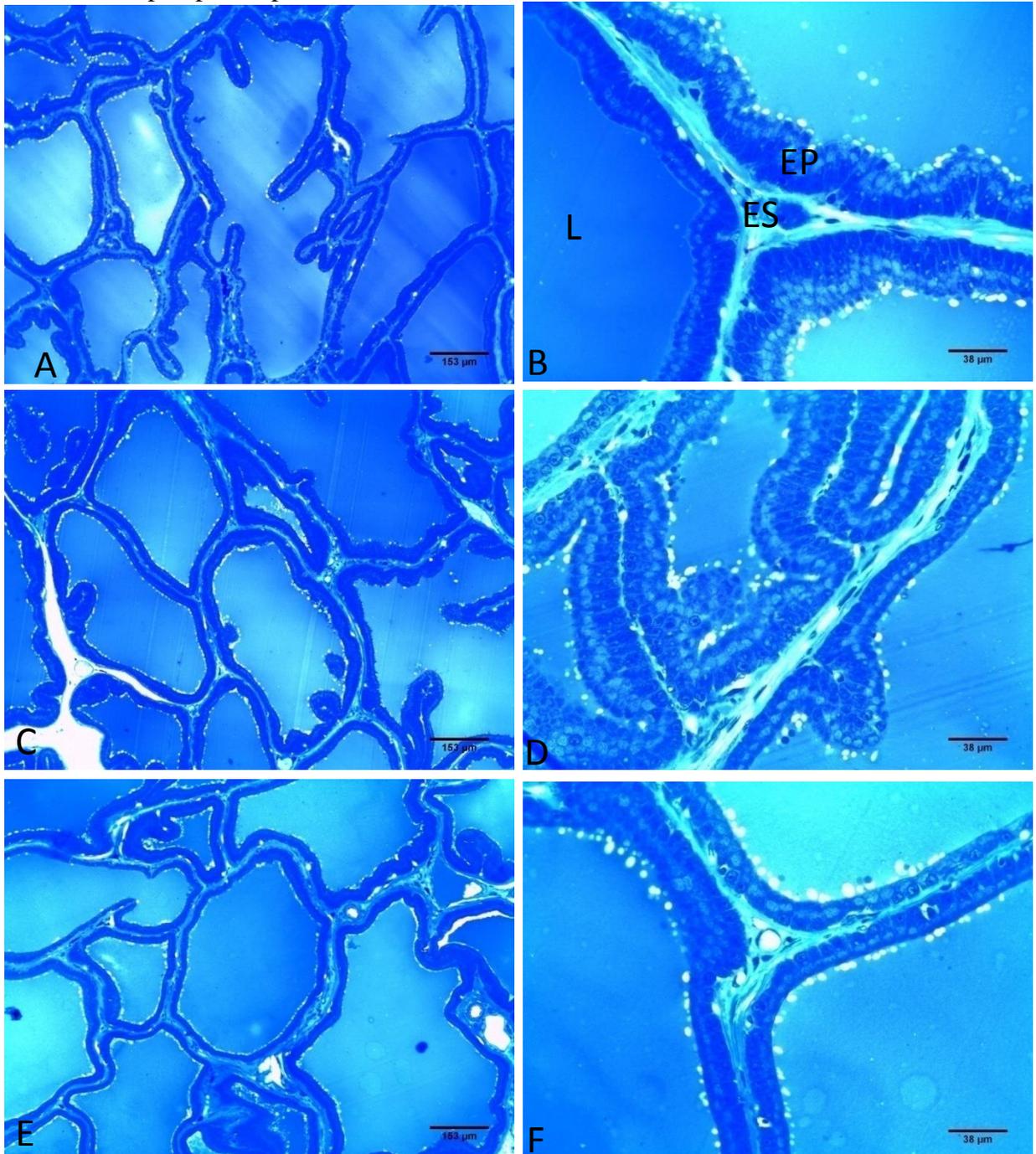
Na figura 10, observam-se fotomicrografias evidenciando as regiões histológicas da glândula prostática. As figuras 10A e 10B pertencem a animais do grupo controle, evidenciando o lúmen, epitélio e estroma prostático; A figura 10C e figura 10D são de animais tratados com 100 mg/kg e figuras 10E e 10F são de animais que receberam 500mg/kg do extrato etanólico de *P. niruri*.

Tabela 7 Altura do Epitélio Prostático (μm) e Volumes do Epitélio Prostático, Estroma Prostático, Lúmen Prostático (mL) de ratos adultos tratados com extrato aquoso de *P. niruri* em diferentes concentrações.

	Grupos Experimentais		
	Controle	100 mg/Kg	500mg/kg
Altura do Epitélio Prostático (μm)	23,67 \pm 1,23a	20,67 \pm 1,79b	22,62 \pm 1,26a
Volume do Epitélio Prostático (mL)	0,25 \pm 0,07	0,23 \pm 0,07	0,24 \pm 0,05
Volume do Estroma Prostático (mL)	0,15 \pm 0,04	0,12 \pm 0,04	0,14 \pm 0,05
Volume do Lúmen Prostático (mL)	0,46 \pm 0,11	0,55 \pm 0,13	0,47 \pm 0,10

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$).

Figura 10 - Fotomicrografias de próstata de ratos tratados ou não com diferentes doses de extrato etanólico de *Phyllanthus niruri*. Figuras 10A e 10B - Fotomicrografias da próstata de animais do grupo controle; aumento de 100 e 400x, respectivamente. Figuras 10C e 10D - Fotomicrografias de animais tratados com 100 mg/kg *Phyllanthus niruri*. Notar detalhe de lúmen, epitélio e estroma prostático; aumento de 100 e 400x, respectivamente. Figuras 10E e 10F - Fotomicrografias de animais tratados com 500 mg/kg *Phyllanthus niruri*. Es - região do estroma, Ep - epitélio prostático, L - indica o lúmen.



A Figura 10 evidencia a glândula prostática dos animais do grupo controle e tratados com 100 e 500mg/kg de *P. niruri*, é possível notar que o epitélio prostático, lúmen e estroma estão bem preservados e sem lesões significativas.

6 DISCUSSÃO

Historicamente, as plantas tem sido consideradas como uma valiosa fonte medicinal. No entanto, poucos estudos relatando a influência de compostos vegetais, sobretudo de *Phyllanthus niruri* sobre os parâmetros testiculares e sua repercussão sobre a função sexual foram conduzidos.

Trabalhos conduzidos por Subeki (2005), Cimanga (2004) e Simons et al. (1995) reportaram efeitos antifertilidade, além de antimaláricos já reportados ao se empregar extrato dessa planta.

Componentes químicos presentes em *Phyllanthus niruri* comprovam algumas de suas propriedades: anti-hipertensiva, hepatoprotetora, analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana além de anti-carcinogênica (JOY e KUTTEN, 1998), anti-nociceptiva, hipoglicêmica, anti-oxidante, diurética, anti-inflamatória, tratamentos hepatotóxico, hepatite B, entre outros (BAGALKOTKAR et al., 2006; MANJREKAR, 2008).

Avaliou-se com o presente estudo a influência de diferentes doses de extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre os parâmetros histomorfométricos de testículos e próstata de ratos adultos, com repercussão em níveis séricos de testosterona, assim como possíveis efeitos tóxicos sobre fígado e rins.

Com relação ao peso corporal e peso testicular de animais tratados com *P. niruri*, esses sofreram tendência à redução, mas não de forma significativa. Por outro lado, Mali et al. (2002) ao administrar o extrato etanólico da raiz de *Martynia annua* obtiveram redução do peso corporal e testicular, além de redução de peso em órgãos andrógeno-dependentes tais como: próstata, epidídimo e glândula seminal.

Em nosso estudo, não foram observadas alterações em neste parâmetro. Do mesmo modo, Kooti et al. (2014), ao avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Apium graveolens* sobre os testículos do rato e observaram que não houve diferença significativa no peso dos testículos nas duas doses aplicadas. No presente estudo também não se constatou redução nesse parâmetro o que reflete ausência de toxicidade do extrato etanólico de *P. niruri*.

O diâmetro do túbulo e altura do epitélio seminífero são parâmetros importantes de avaliação da atividade da espermatogênese (França e Russel, 1998). No presente estudo, não foram observadas alterações nos parâmetros citados anteriormente. Mirhoseini et al., (2012), descreveram uma redução significativa nesses parâmetros com 35 dias do extrato aquoso na dosagem de 200 mg/kg da flor do cártamo (*Carthamus tinctorius L.*). Hardani et al., (2015), observaram que houve tendência de aumento na altura do epitélio e diâmetro tubular em ratos tratados com extrato aquoso de aipo (*Apium graveolens L.*) nas concentrações de 100 e 200 mg/kg.

A célula de Sertoli em indivíduos adultos oferece sustentação, nutrição, aporte hormonal e formam a barreira hematotesticular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Este tipo celular possui relação direta com o comprimento tubular e a produção espermática (França e Russel, 1998). Substâncias xenobióticas podem exercer efeitos tóxicos sobre diversos tipos celulares do testículo. Contudo, substâncias que agem diretamente sobre as células de Sertoli podem provocar disrupção sobre o epitélio germinativo e conseqüentemente sobre a produção espermática (SILVA JUNIOR et al. 2006). De acordo com Kooti et al. (2014), o extrato hidroalcoólico na dose 200 mg/kg de *Apium graveolens* promoveu aumento na população de células de Sertoli. No atual experimento, utilizando diferentes doses de extrato etanólico de *P. niruri*, a população das células de Sertoli não diferiu entre os grupos, porém notou-se uma redução de 27,5 % na dosagem de 500 mg/kg.

Segundo Couto (2005), diferentes extratos de *P. niruri* possuem compostos como alcalóides, flavonóides e saponinas, os quais podem influenciar a atividade androgênica nos testículos de ratos. Sendo a saponina o principal estimulante da produção de andrógenos, tais como a testosterona.

As células de Leydig sofreram redução do diâmetro nuclear e volume celular, sobre influência do extrato etanólico de *P. niruri*. De acordo com França et al. (2005), Estes parâmetros refletem a atividade esteroidogênica destas células. Contudo, a população destas células não sofreu redução, assim como os níveis de testosterona sérica.

A próstata e o epidídimo são órgãos hormônios dependentes (VARGAS, 2013) e não tiveram redução de peso após administração de diferentes dosagens de extrato etanólico de *P. niruri*. De acordo com os nossos resultados a próstata ventral teve redução 13% na altura do epitélio na dosagem de 100mg/kg. Contudo o mesmo evento

não se repetiu para maior dose. Possivelmente o modo de extração não favoreceu a atuação da saponina nesses parâmetros, uma vez que os resultados encontrados em estudo realizado por Oliveira et al. (2016) do extrato aquoso do *P. niruri* obtiveram resultados divergentes a esse parâmetro, uma vez que, a utilização do extrato aquoso proporcionou tendência de elevação destes parâmetro.

7 CONCLUSÕES

1. Parâmetros testiculares diretamente relacionados com a produção espermática não foram influenciados negativamente pelo extrato etanólico de *P. niruri* nas doses administradas.
2. Diferentes doses de extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* não exerceram efeitos tóxicos sobre a espermatogênese dos animais tratados.
3. O extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* reduziu o volume do compartimento intertubular.
4. O diâmetro nuclear e volume médio das células de Leydig foram influenciados negativamente pelas diferentes doses do extrato etanólico de *P. niruri*.
5. Os níveis séricos de testosterona não foram alterados com a administração de diferentes doses do extrato etanólico de *Phyllanthus niruri*.
6. O extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* reduziu o peso dos rins e produziu lesões relevantes no parênquima hepático e renal, compatíveis com toxicidade e insuficiência renal, respectivamente.

REFERÊNCIAS

BAGALKOTKAR, G.S. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 12, p. 1559-70, 2006.

BRANDAO, H. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, vol. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BARROS, M. E.; et al. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. **Urological Research**, v.34, n. 6, p. 351-357, 2006.

BARROS, M.E.; SCHOR, N.; BOIM, M.A. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization *in vitro*. **Urological Research**, v. 30, n. 6, p. 374–397, 2003.

BRASIL. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Farmacopeia Brasileira. 5a ed. Volume 1. Brasília: Anvisa, 2010a.

BRASIL. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Resolução ANVISA RDC n. 14, de 31 de março de 2010. Dispoe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 5 abr. 2010b.

CALIXTO, J. B.; et al. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Research Reviews**, v.18, n. 4, p. 225-258, 1998.

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

COUTO, A. G. **Desenvolvimento tecnológico de comprimidos a partir de granulados do produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* e o controle da qualidade da matéria- prima vegetal a partir do seu cultivo**. (Tese - Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

COUTO, A. G.; et al. Antiinflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 124-131, 2013a.

COUTO, A. G. et al. Chemical and technological evaluation of the *Phyllanthus niruri* aerial parts as a function of cultivation and harvesting conditions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 36-43, 2013b.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZGARCIA, F. AND REGADERA, J. (eds). Male reproduction - a multidisciplinary overview. **Madrid, Churchill Communications**, p. 198-219, 1998.

GOYAL, H. O. et al. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of testis fluid. **Anat Rec.** v. 2 n. 54 p. 508-520, 1999.

HARDANI A, et al. Effects of aqueous extract of celery (*Apium graveolens* L.) leaves on spermatogenesis in healthy male rats. **Avicenna J Phytomed.** v. 5 n. 2. p. 111, 2015.

KOOTI, W. et al. The Effects of Hydroalcoholic Extract of *Apium graveolens* Leaf on the Number of Sexual Cells and Testicular Structure in Rat. **Jundishapur J Nat Pharm Prod.** v. 9 n. 4 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Texto e atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 415-430, 2004.

MALI P. C. et al. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 82. p. 61-67, 2002.

MATOS, F. J.A. **Introdução a fitoquímica industrial.** Fortaleza. Universidade Federal do Ceará, 1997.

MORAIS, D.B. et al. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in testes of the bat *Sturnira lilium*. **Animal reproduction science**, 2014.

MOREIRA, J. et al. Antihyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, p. 318–323, 2013.

PHARMACIA BRASILEIRA. **Saúde elabora relação de plantas medicinais de interesse ao SUS.** Ano XII, n. 70, p. 77-78, 2009.

SILVA JÚNIOR, V.A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p.1-10, 2006.

VARGAS, R. A. **Efeito crônico da administração de esteróide anabólico androgênico na próstata de ratos.** (Dissertação de Mestrado). Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2013).

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. **Plantas medicinais: cura segura?** Quim. Nova, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos aquoso e etanólico de *Phyllanthus niruri* nas dosagens de 100 e 500 mg/kg não indicaram efeito antiesteroideogênico significativo sobre os parâmetros de testiculares e prostáticos dos ratos adultos.

A análise dos rins e fígado dos animais tratados com *P niruri* demonstrou que os órgãos foram submetidos a um desafio toxicológico em ambos os tratamentos. Contudo, no extrato aquoso seu efeito foi menor, com graus de lesões inferiores aos achados para o extrato etanólico da planta nas duas doses utilizadas.