

## **Avaliação terapêutica de *Inula crithmoides* L. em órgãos reprodutores de ratinhos expostos a tetracloreto de carbono**

*Inula crithmoides* é uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional devido principalmente aos seus efeitos hepatoprotectores. Contudo, o objectivo deste trabalho foi estudar os efeitos protectores e/ou regeneradores de *I. crithmoides*, em órgãos reprodutores de ratinhos. A actividade protectora ou regeneradora dos frutos desta planta foi estudada por análise histopatológica, usando o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), como indutor de toxicidade. Os animais foram divididos em 5 grupos: Grupo I - grupo de controlo positivo (CCl<sub>4</sub>); Grupo II - grupo de controlo negativo (NaCl 0,9%); Grupo III - grupo tratado apenas com *I. crithmoides*; Grupo IV grupo pré-tratado com CCl<sub>4</sub> no primeiro dia, seguido de tratamento com *I. crithmoides*; e Grupo V – grupo tratado com *I. crithmoides* durante 4 dias, e no último dia tratado com CCl<sub>4</sub>. O período de exposição foi de 6 dias, excepto para o grupo I, que foi de 2. Todos os animais foram pesados e injectados subcutaneamente e sacrificados 24h após a última injeção. Testículos e epidídimos foram recolhidos para análise histológica convencional. As secções histológicas de testículo apresentaram vacuolização, libertação e acumulação de células imaturas e células em degenerescência no lúmen do túbulo seminífero, nos grupos tratados com CCl<sub>4</sub> (I, IV e V). Os cortes de epidídimo revelaram sinais de vacuolização e em todos os grupos se evidenciaram zonas desprovidas de espermatozóides. Contudo, estas alterações foram negligenciáveis, dado que correspondem a menos de 10% do total da secção analisada. Os grupos IV e V revelaram menores alterações histopatológicas, comparativamente com o controlo positivo.

### **Palavras-chave**

*Inula crithmoides*

toxicidade

testículo

epidídimo

tetracloreto de carbono

histopatologia

Sara Rodrigues<sup>1</sup> •

Helena Silva<sup>2</sup>

Maria de Lourdes Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

<sup>2</sup> Departamento de Biologia e CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro

<sup>3</sup> Departamento de Biologia e CICECO (Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos), Universidade de Aveiro

• srrodrigues@ua.pt

## INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas como terapias para várias doenças, sendo administradas sob a forma de chás e/ou integradas em fármacos. Contudo, a planta medicinal só pode ser considerada terapêutica quando usada correctamente, podendo assim ser incluída na farmacopeia. De facto, foram as observações populares sobre o uso e a eficácia dessas plantas que contribuíram, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, despertando o interesse de investigadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo a botânica, a farmacologia, a fitoquímica e a fitoterapia (Maciel et al., 2002).

A Organização Mundial de Saúde definiu a medicina tradicional como um conjunto de práticas terapêuticas que existem há séculos (Singh et al., 2009; Kampoj, 2000). Estas incluem o uso de plantas medicinais, de minerais e matéria orgânica (Kampoj, 2000). A popularidade das chamadas plantas medicinais tem aumentado com o passar dos anos devido à sua eficácia, aos reduzidos efeitos secundários e ao custo relativamente baixo, embora os seus componentes biológicos activos sejam muitas vezes desconhecidos (Kampoj, 2000). Por esta razão, torna-se importante fornecer provas científicas que justifiquem o seu uso medicinal.

O género *Inula*, família Asteraceae, inclui mais de 100 espécies e é encontrado principalmente na Europa, África e Ásia. As suas partes aéreas são usadas na medicina tradicional para tratamento de várias doenças (Abdel-Wahhad et al, 2008). Tendo em consideração os vários estudos efectuados com outras espécies do género *Inula* (Rao et al., 1997; Song et al, 2000; Kobayashi et al., 2002; Gholap et al., 2003; Saygi et al., 2003; Abdel-Wahhad et al., 2008), tornou-se pertinente investigar se *Inula crithmoides* apresenta a mesma actividade protectora sobre o sistema reprodutor masculino de ratinhos. *Inula crithmoides* tem sido estudada principalmente pelo seu conteúdo em flavonóides, entre outros constituintes e óleos essenciais (Abdel-Wahhad et al., 2008). Os compostos fenólicos, nomeadamente os flavonóides, são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis e têm sido estudados no contexto da sua actividade biológica, nomeadamente actividade antioxidante (Kähkönen et al., 1999; Sakihama et al., 2002), com efeitos anti-mutagénicos e anti-cancerígenos (Sakihama et al., 2002).

Espécies de *Inula* (*I. britannica*, *I. racemosa*, *I. hupahensis*, *I. serrata*, *I. heterolepsis*, *I. japonica*) são amplamente utilizadas na medicina popular em muitos países (Saygi et al, 2003). Existem alguns estudos científicos sobre os diferentes efeitos benéficos de várias espécies de *Inula*. Dois estudos referem que *I. racemosa* e *I. britannica* têm efeitos hepatoprotectores sobre a lesão hepática aguda em ratos e ratinhos (Rao et al., 1997; Song et al., 2000). Foi confirmado que as raízes de *I. racemosa* têm propriedades anti-inflamatórias, anti-sépticas, antipiréticas e hipoglicémicas (Gholap et al., 2003). Relativamente ao extracto aquoso de flores de *I. britannica*, este demonstrou prevenir, imunologicamente, a hepatite em ratos (Song et al., 2000; Kobayashi et al., 2002). Nestes estudos, os resultados demonstraram o efeito preventivo sobre a diabetes, regulando a produção de células imunitárias.

O efeito do extracto aquoso da raiz de *I. heterolepsis* também foi testado para determinar a sua capacidade de tratar lesões hepáticas induzidas experimentalmente pelo álcool. Órgãos como o fígado, rins e testículos foram analisados histopatologicamente, revelando que o grau de lesão e recuperação dos ratos tratados com *I. heterolepsis* foi significativamente diferente do controlo (Saygi et al., 2003). A literatura apresenta

múltiplos estudos sobre efeitos de extractos de plantas no fígado e nos rins, o que não se verifica para órgãos reprodutores como o testículo. Os efeitos anti-diabéticos e hipolipemiante (redução dos níveis de lípidos no sangue) do extracto aquoso de flores de *I. japonica* foram confirmados em ratos diabéticos (Shan et al., 2006).

Um outro estudo desenvolvido com *I. crithmoides*, avaliou o efeito protector do extracto aquoso das suas partes aéreas, contra a mutagenicidade e stress oxidativo provocados por uma micotoxina frequentemente presente em cereais e produtos agrícolas. Através de estudos bioquímicos provou-se que o extracto de *I. crithmoides* foi eficaz nesse caso. O extracto da planta neutralizou o stress oxidativo e forneceu protecção contra a citotoxicidade (Abdel-Wahhad et al., 2008).

O tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) é uma substância líquida transparente, de cheiro adocicado e muito volátil, pertence à classe dos hidrocarbonetos halogenados. Foi bastante utilizado até finais da década de 70, do século XX, como insecticida, em extintores ou produtos de limpeza a seco (ATSDR, 2005).

O  $\text{CCl}_4$  pode entrar no organismo através do ar contaminado, pela ingestão de alimentos ou água contaminados. Tem efeitos negativos no sistema nervoso central em situações a elevadas concentrações, podendo causar cancro ou mesmo a morte. Para além disso, a exposição a elevadas concentrações pode levar a efeitos sistémicos negativos (ao nível respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, hematológico, hepático, renal e cutâneo), assim como a perturbações nos sistemas imunológico, reprodutivo e no desenvolvimento (ATSDR, 2005). Vários estudos de hepatoprotecção com extractos de plantas têm sido efectuados face à toxicidade induzida por químicos, tendo o tetracloreto de carbono sido amplamente usado em modelos animais (Janakat et al., 2002; Horn et al., 2006; Jadon et al., 2007; Lee et al., 2008). Apesar de ser mais utilizado para em estudos de hepatotoxicidade, como a cirrose, a necrose que se pensa serem devidos à formação de intermediários reactivos, no presente trabalho será avaliado o seu efeito ao nível reprodutor, nomeadamente testículo e epidídimo. De facto, estudos anteriores demonstram que ratos com danos hepáticos apresentaram redução no peso testicular, severas anomalias histológicas, perda de células germinativas, entre outras irregularidades (Cortázar et al., 2004).

Apesar dos vários estudos no fígado e nos rins, desenvolvidos com espécies do género *Inula*, pouco se conhece dos efeitos dos respectivos extractos em órgãos reprodutores (Saygi et al., 2003). O presente trabalho teve assim por objectivo avaliar os efeitos protectores e/ou preventivos dos frutos de *Inula crithmoides* na toxicidade induzida pelo  $\text{CCl}_4$  no testículo e no epidídimo de ratinho (*Mus musculus* L.), através de técnicas histológicas, visando a aplicação futura no desenvolvimento de novos medicamentos que, tendo efeitos protectores e mesmo regeneradores, não interfiram com o bom funcionamento destes órgãos.



## METODOLOGIA

### ***As Material vegetal***

O material vegetal – *Inula crithmoides* L. – foi devidamente identificado, efectuando-se em seguida colheitas de partes aéreas, nomeadamente inflorescências no estado de frutificação (cipselas), a 5 de Novembro de 2008, em Aveiro, na zona de sapal na rua da Pêga (Latitude: 40° 38' 1" N; Longitude: 8° 39' 41" W). O material vegetal recolhido encontrava-se já seco, sendo apenas visíveis os caules e as inflorescências no

estado de frutificação, como mostra a Figura 1. Relativamente às condições de colheita, considerou-se o estado de desenvolvimento da planta, excluindo-se da colheita os espécimes mais debilitados (ausência total ou quase total de inflorescências no estado de frutificação) e os que se encontravam molhados. O material vegetal foi transportado em sacos de papel até ao laboratório, de modo a evitar o apodrecimento das plantas. Após colheita o material foi deixado a secar, durante alguns dias, num local seco, arejado e à sombra.



FIGURA 1: *Inula crithmoides* em frutificação (Fonte: <http://www.biorede.pt/index2.htm> em 14-03-2009).

### **Preparação do extracto de *Inula crithmoides* e outras soluções**

O extracto de partes aéreas (flores no estado de frutificação – cipselas) de *Inula crithmoides* foi preparado de acordo com o método tradicional utilizado no Egipto, a decocção (Song et al., 2000; Abdel-Wahhad et al., 2008). Assim, 100g de *Inula crithmoides* foram fervidas em 1000 mL de água destilada durante uma hora e trinta minutos. De seguida, procedeu-se à filtração da solução utilizando folhas de gaze e, após decantação, o filtrado foi dividido por vários cadinhos (5 ml por cada cadinho), que foram colocados numa estufa a 40°C, até à obtenção de um resíduo sólido, ou seja, o extracto seco precipitado. O rendimento deste procedimento foi de 10%. Posteriormente, o resíduo sólido foi conservado num frasco de vidro, garantindo-se uma atmosfera isenta de humidade. O extracto seco foi ressuscitado no dia anterior à administração em solução salina (NaCl a 0,9%) e esterilizado, recorrendo à passagem por filtros para seringa com poro de 0.2 µm. Prepararam-se soluções de extracto de cipselas na concentração 0,25g kg<sup>-1</sup>. O volume administrado da solução de extracto de *I. crithmoides*, por ratinho, foi de cerca de 0,25 ml. Preparou-se também uma solução de tetracloreto de carbono (controlo positivo) de concentração 1,5mg Kg<sup>-1</sup>, utilizando azeite como veículo para a administração (1:1). O volume administrado de CCl<sub>4</sub>/azeite foi de 0,25 ml por ratinho. O azeite foi usado como solvente de CCl<sub>4</sub>, dado que não foram encontradas referências que citem este composto como danoso para o organismo, nomeadamente para órgãos reprodutores. Como controlo negativo utilizou-se uma solução de NaCl 0,9%, sendo 0,25ml o volume administrado por ratinho.

### **Animais e tratamento**

No presente trabalho foram utilizados 25 ratinhos (*Mus musculus* L.) machos ICR-CD1, com sete semanas, pesando entre 27 e 34 g e provenientes de Charles River Laboratories. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato transparente, numa câmara climatizada do biotério do Departamento de Biologia, da Universidade de Aveiro, sob condições ambientais normalizadas: 22±2°C de temperatura, fotoperíodo luz/escuridão de 12h/12h e humidade relativa 40 – 60%. Os animais tiveram livre acesso a alimento e a água. Os animais foram previamente pesados antes de iniciar a exposição e diariamente até ao seu sacrifício, e foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=5):

GRUPO I: Controlo positivo com CCl<sub>4</sub>/azeite, injectado com dose única de 1,5 ml Kg<sup>-1</sup>.

GRUPO II: Controlo negativo com NaCl 0,9%, injectado diariamente num volume de 0,25 ml durante 5 dias.

GRUPO III: Tratamento com extracto de *Inula crithmoides*, injectada diariamente, durante 5 dias. A dose administrada foi de 0,25g Kg<sup>-1</sup> no volume de 0,25 ml.

GRUPO IV: Tratamento com  $\text{CCl}_4$  e *I. crithmoides*. O  $\text{CCl}_4$  foi injectado na dose de  $1,5 \text{ ml Kg}^{-1}$  no primeiro dia e nos 4 dias seguintes administrado o extracto de *I. Crithmoides* na concentração de  $0,25 \text{ g Kg}^{-1}$ . Este tratamento teve como objectivo avaliar o efeito regenerador do extracto.

GRUPO V: Tratamento com *I. crithmoides* e  $\text{CCl}_4$ . Os ratinhos foram injectados com o extracto de *I. Crithmoides* na concentração de  $0,25 \text{ g Kg}^{-1}$ , durante 4 dias e no quinto dia foi administrado o  $\text{CCl}_4$ , na dose de  $1,5 \text{ ml Kg}^{-1}$ . Este tratamento teve por objectivo avaliar o efeito protector do extracto.

Todos os compostos usados ( $\text{CCl}_4$ , *I. crithmoides*,  $\text{NaCl}$ ) foram administrados por via subcutânea e os animais foram sacrificados 24h após a última injeção, excepto para o grupo I. Para o grupo do controlo positivo ( $\text{CCl}_4$ ) o sacrifício ocorreu após 48h, após injeção com dose única. Os animais foram pesados diariamente e no momento do sacrifício.

### **Recolha de órgãos e técnica histológica**

Os ratinhos foram pesados numa balança (Precisa 220 M). Após abertura da cavidade escrotal e observação macroscópica dos órgãos, removeram-se os testículos e epidídimos, os quais foram também pesados numa balança (AND modelo HR-120) e submetidos a métodos histológicos. De seguida, fragmentos dos órgãos acima referidos foram imersos em fixador de Bouin. Após a fixação, procedeu-se à desidratação numa série crescente de etanol, à qual se seguiu a impregnação e a inclusão em parafina (grau de fusão  $56\text{-}58^\circ\text{C}$ ). Os cortes histológicos foram efectuados com a espessura de  $6\text{-}8 \mu\text{m}$ , utilizando um micrótopo (Leitz 1512). Após secagem na estufa, procedeu-se à desparafinação e rehidratação, seguida de coloração com hematoxilina-eosina. E posteriormente, efectuou-se nova desidratação e clareamento com xilol. As preparações foram montadas em meio Eukitt® e observadas ao microscópio óptico (Olympus modelo BX41TF), com sistema fotográfico acoplado. Foram analisados cerca de 100 túbulos seminíferos de cada secção de testículo, de todos os ratinhos pertencentes aos vários grupos.

### **Análise estatística**

Foi usado o programa SIGMASTAT 3.5 (Systat Software Inc., CA, EUA) na análise dos dados obtidos, nomeadamente pesos corporais e rácios dos órgãos. Os rácios dos órgãos, em percentagem, foram calculados segundo a fórmula  $(\text{Peso do órgão} / \text{Peso do corpo final}) \times 100$  e foi realizada uma análise de variância (ANOVA) unifactorial para avaliar se existiam diferenças entre os vários grupos, relativamente a pesos corporais e rácios de órgãos. A análise dos rácios permitiu identificar diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos, para  $p \leq 0,05$ . Sempre que se rejeitou a hipótese nula, foi usado o teste de Tukey, para analisar as possíveis diferenças significativas entre os vários grupos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Um nível de significância de  $p \leq 0,05$  foi usado nos testes de hipóteses.

## RESULTADOS

### **Sobrevivência e comportamento dos animais**

No presente trabalho, a taxa de sobrevivência dos animais em estudo foi de 88%. Relativamente ao comportamento e aspecto dos animais observou-se que: os ratinhos do Grupo I (controlo positivo) demonstraram menor actividade e alterações visíveis na pelagem, sugerindo perda de pêlos e engrossamento dos mesmos, sendo menos macios ao toque. Foram sacrificados após 48h da injeção com

CCl<sub>4</sub>, devido ao seu estado debilitado, nomeadamente ausência quase total de movimento que sugeria que não aguentariam o período de exposição. Os ratinhos do Grupo II não apresentaram quaisquer alterações, quer fisicamente, quer a nível comportamental; os do Grupo III não apresentaram quaisquer modificações comportamentais ou de aspecto físico; os ratinhos do Grupo IV apresentaram pouca actividade e alterações evidentes na pelagem. Três ratinhos morreram no decurso da experiência, sendo que um morreu 24h após a 1ª injeção com extracto de *I. crithmoides* e os outros 2, passadas 24h da 2ª injeção com extracto de *I. crithmoides*. Os restantes 2 ratinhos do grupo IV foram sacrificados 24h depois da 2ª injeção, uma vez que demonstraram sinais de debilidade, quer ao nível da actividade, quer ao nível da pelagem. Os ratinhos do Grupo V apresentaram sinais de perda de actividade 24h após a injeção com CCl<sub>4</sub>, coincidindo com o dia do sacrifício. Não se notaram quaisquer alterações no consumo de alimento e água nos vários grupos, excepto o grupo I e IV, o qual apresentou menor consumo de alimento que os restantes grupos.

### Peso corporal ao longo dos tratamentos

O peso dos animais dos vários grupos foi registado diariamente (Figura 2). No grupo de animais injectado apenas com extracto de *Inula crithmoides* constatou-se um aumento de peso desde o início até ao final do tratamento, o que não se verificou nos grupos I, IV e V. Quanto ao grupo de controlo negativo verificou-se um aumento gradual do peso médio corporal ao longo do tempo de exposição, tendo sido observado um ligeiro decréscimo no último dia.

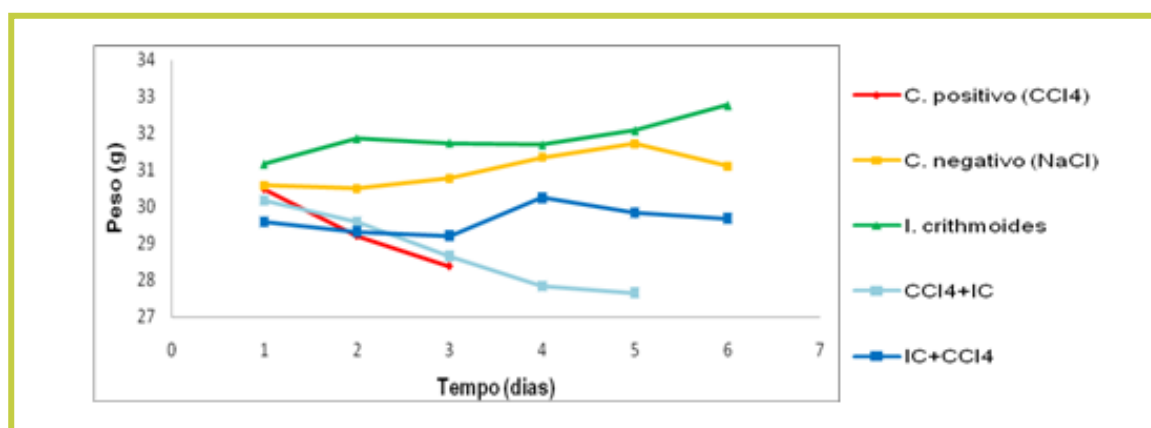


FIGURA 2: Evolução das médias dos pesos corporais de cada grupo em função do tempo de experiência, para os diferentes grupos de tratamento.

A partir do gráfico da Figura 3, podemos verificar existem diferenças significativas entre os tratamentos ( $F=6,838$ ;  $gl\ 4,19$ ;  $P = 0,001$ ), relativamente ao peso registado no final da exposição, tendo em conta os períodos de exposição para cada grupo. O grupo III foi significativamente diferente do grupo I (CCl<sub>4</sub>) e do grupo IV (CCl<sub>4</sub>+*I. crithmoides*) e grupo II (NaCl) foi significativamente diferente do grupo IV (CCl<sub>4</sub>+*I. crithmoides*) no que diz respeito ao peso corporal, após o período de exposição. As letras **a**, **b** e **c** representadas na figura 3, indicam quais os grupos significativamente diferentes com base nos resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey. Ou seja tratamentos com letras iguais não são significativamente diferentes, enquanto que os representados por letras diferentes são significativamente diferentes entre si.

**Aspecto macroscópico dos órgãos em estudo**

Não se observaram alterações macroscópicas nos órgãos dos diversos grupos.

**Valores de rácios dos órgãos dos vários grupos**

Procedeu-se, de seguida, à análise estatística com os valores de rácio dos órgãos.

Para o epidídimo esquerdo existem diferenças significativas entre Grupo I e II, como é apresentado na tabela I e

figura 4. Para os restantes órgãos (testículo esquerdo e direito e epidídimo direito) não existem diferenças significativas entre os grupos de tratamento.

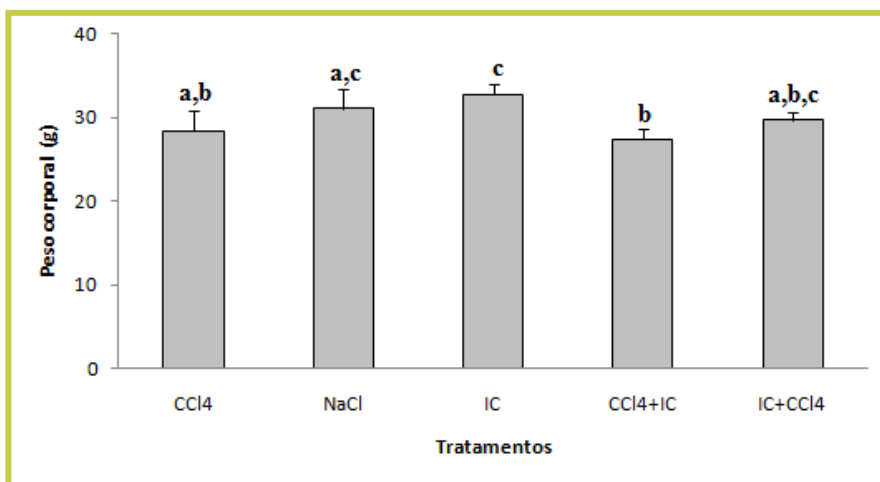


FIGURA 3: Pesos corporais registados no final da exposição, tendo em conta os períodos de exposição de cada grupo de tratamento. Os valores expressam a média ± desvio-padrão (IC representa *I. crithmoides*). As letras a, b e c representam grupos com diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre os tratamentos

TABELA I: Quadro-resumo de análise de variância (ANOVA) unifactorial para os tratamentos efectuados, relativamente ao testículo esquerdo, testículo direito, epidídimo esquerdo e epidídimo direito. Para cada um, estão representados os graus de liberdade (gl); variância residual (MS) e estatística F (com valor de P associado).

	g.l. (Graus de liberdade)	MS (Variância)	F (Valor do teste)	P
Testículo esquerdo	4, 17	0,00119	0,810	0,536
Testículo direito	4, 17	0,00115	0,243	0,910
Epidídimo esquerdo	4, 17	0,00121	3,939	<b>0,019</b>
Epidídimo direito	4, 17	0,000536	1,178	0,179

A partir da análise do gráfico da figura 4, podemos constatar que ocorreram diferenças significativas entre os controlos positivo ( $CCl_4$ ) e negativo (NaCl), para o epidídimo esquerdo. Para os restantes órgãos e respectivos tratamentos, não se observaram diferenças significativas.

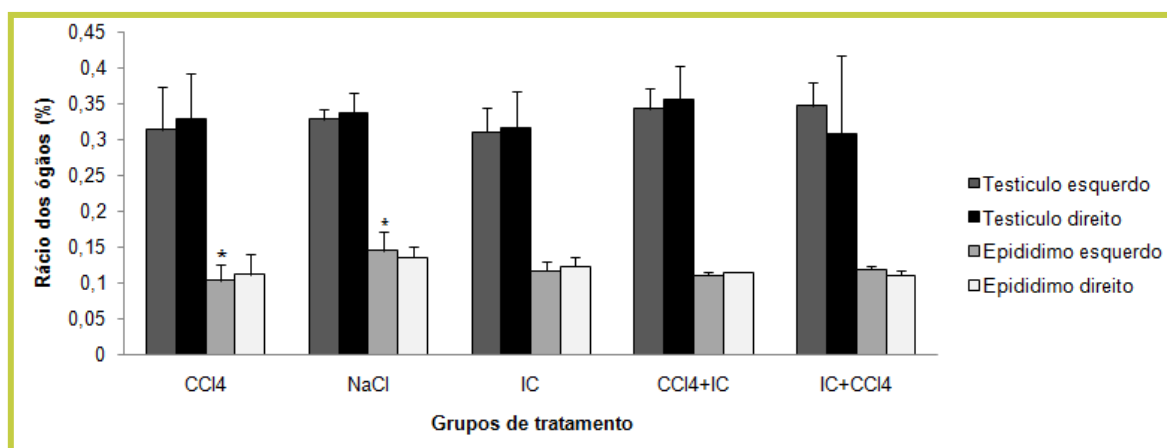


FIGURA 4: Efeito dos tratamentos no rácio dos órgãos (testículo esquerdo, testículo direito, epidídimo esquerdo e epidídimo direito). Os valores expressam a média ± desvio-padrão. (IC representa o *I. crithmoides*). Grupos com diferenças significativas entre si estão representados com “\*”, para  $p < 0,05$ .

### Observação histopatológica de secções de testículo

Foram observadas algumas alterações histológicas, nomeadamente vacuolização, acumulação de células imaturas no lúmen do túbulo seminífero, presença de células em degenerescência<sup>1</sup> e ausência de espermatozoides nos animais do Grupo I (CCl<sub>4</sub>) (Figura 5).

As secções de testículo do grupo de controlo positivo revelaram algumas alterações histopatológicas, nomeadamente a libertação de células imaturas para o lúmen do túbulo seminífero (Figura 5A). Também foi visível a presença de vacúolos e células em degenerescência (Figura 5B). As secções de testículo do grupo de controlo negativo (NaCl) mostraram uma estrutura testicular normal. Contudo, também foram visíveis alterações histopatológicas, embora negligenciáveis: observaram-se alguns vacúolos no epitélio seminífero e libertação de células imaturas; todavia, a maioria das secções observadas apresentavam estrutura normal (Figura 6).

Nos ratinhos tratados apenas com *I. crithmoides* diluída em NaCl, as secções de testículo exibiram a sua estrutura normal. Contudo registaram-se algumas diferenças, também negligenciáveis, relativamente ao grupo de controlo negativo. Assim, foram visíveis alguns vacúolos e células em degenerescência (Figura 7).

A observação das secções de testículo dos grupos IV e V revelou alguma alteração quando comparado com grupo de controlo positivo. Em termos da estrutura geral notou-se a regeneração do epitélio seminífero, nomeadamente redução do número de células imaturas no lúmen, assim como vacuolização. As referidas melhorias aparentaram ser mais perceptíveis no grupo de tratamento V do que no IV, como demonstram as Figuras 8 e 9.

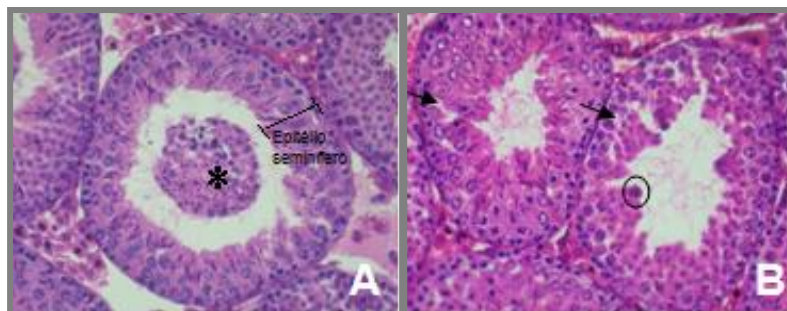


FIGURA 5: Alterações histopatológicas provocadas pela intoxicação por CCl<sub>4</sub> no testículo de ratinhos (Coloração H&E). (A) Libertação de células imaturas no lúmen (\*) do túbulo seminífero, ampliação 400x; (B) Túbulos seminíferos apresentando vacuolização (seta preta) e células em degenerescência (O), ampliação 400x.

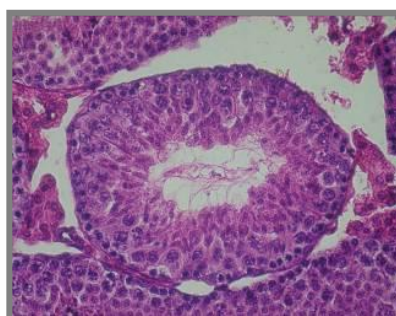


FIGURA 6: Histologia normal do túbulo seminífero, ampliação 400x. (Coloração H&E) correspondente ao grupo II.

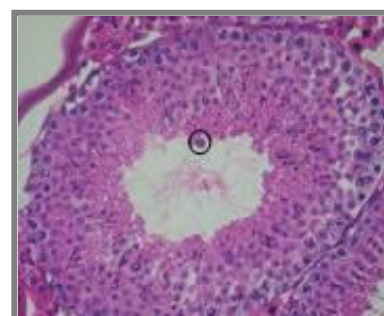


FIGURA 7: Túbulo seminífero apresentando células em degenerescência (O), ampliação 400x (Coloração H&E), correspondente ao grupo III.

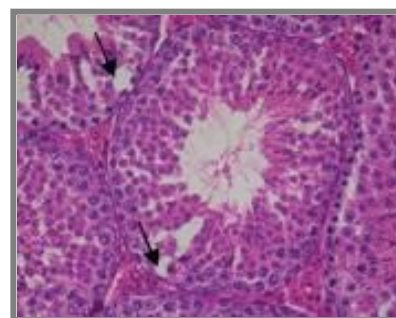


FIGURA 8: Túbulo seminífero apresentando vacuolização (seta preta), ampliação 400x. (Coloração H&E), em ratinhos do Grupo IV.

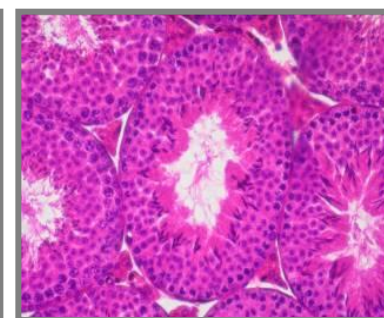


FIGURA 9: Histologia normal de túbulos seminíferos, ampliação 400x. (Coloração H&E), em ratinhos do Grupo V.

<sup>1</sup> Necrose de espermátides



No grupo em que o CCl<sub>4</sub> foi administrado como pré-tratamento, antes de ser administrado o extracto de *I. crithmoides* (Grupo IV), os túbulos seminíferos apresentaram algumas alterações histopatológicas, também representadas no grupo de controlo positivo, nomeadamente libertação de células imaturas para o lúmen, assim como vacuolização (Figura 8).

As secções de testículo do grupo de ratinhos tratados com extracto de *I. crithmoides* seguido de CCl<sub>4</sub> (Grupo V) mostraram menos alterações, relativamente ao controlo positivo, apresentando uma estrutura tipicamente normal (Figura 9).

### **Observação histopatológica de secções de epidídimo**

As várias secções do epidídimo demonstraram, em todos os grupos de tratamento, a ausência total ou parcial de espermatozóides na região da cabeça como evidencia a Figura 10. Relativamente ao grupo de controlo positivo, as secções do epidídimo apresentaram algumas alterações histopatológicas, nomeadamente presença de vacúolos (Figura 11). Contudo, à excepção desta região do epidídimo, todas as células apresentavam organização normal, como mostra a Figura 12.

As secções do epidídimo de todos os grupos, à excepção do grupo tratado com CCl<sub>4</sub> (Grupo I) apresentaram a sua estrutura normal. No grupo I observou-se uma pequena percentagem de células com vacuolização (~1-3%) (Figura 11).

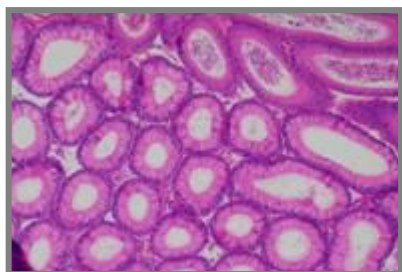


FIGURA 10: Visão geral da secção do epidídimo de ratinho, desprovida de espermatozóides, ampliação 1000x. (Coloração H&E), em ratinhos do grupo II.

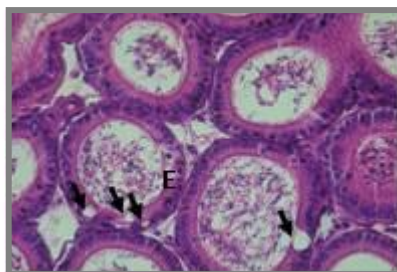


FIGURA 11: Células com epitélio colunar pseudo-estratificado (E) apresentando vacuolização (seta preta), ampliação 400x. (Coloração H&E), em ratinhos do grupo I.

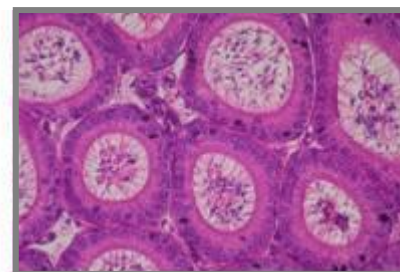


FIGURA 12: Histologia normal das células do epidídimo de ratinho, ampliação 400x. (Coloração H&E), em ratinhos do grupo III.



## **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

No presente estudo procurou-se verificar se as inflorescências no estado de frutificação de *Inula crithmoides* possuíam efeito protector ou regenerador face à indução de danos pelo tetracloreto de carbono. Este trabalho surgiu no decorrer de um trabalho experimental que se realizava no laboratório de Histologia da Universidade de Aveiro, sendo o propósito a avaliação do efeito de *Inula crithmoides* na mitigação da hepatotoxicidade induzida por CCl<sub>4</sub>. Deste modo, toda experiência original foi planeada de acordo com avaliação ao nível hepático. Numa perspectiva de complementar este estudo e seguindo a tendência observada na literatura para a análise de diversos órgãos e sistemas (Janakat et al., 2002; Horn et al., 2006; Jadon et al., 2007; Lee et al., 2008), surgiu a avaliação desse mesmo efeito ao nível reprodutor (testículo e epidídimo).

No presente estudo foi registada alguma mortalidade nos indivíduos tratados inicialmente com CCl<sub>4</sub>, que poderá estar relacionada com variações na susceptibilidade e/ou condição fisiológica individual e que eventualmente se terão repercutido na tolerância dos ratinhos a este tratamento. Os animais injectados com CCl<sub>4</sub> (I, IV e V) apresentaram redução de peso ao longo da experiência, após injeção, o que é concordante com os resultados publicados por Cortázar e colaboradores (2004). Contudo, os ratinhos do grupo I e IV não cumpriram o tempo de exposição pois apresentavam-se muito debilitados. Todavia, esta redução foi mais acentuada nos Grupos I (CCl<sub>4</sub>) e IV (CCl<sub>4</sub> + *I. crithmoides*) do que no Grupo V, o que poderá indicar um efeito protector de *I. crithmoides*, para organismos do grupo V. Relativamente aos restantes grupos, apenas se regista uma pequena redução ao nível do peso corporal para o Grupo II, contudo é negligenciável, relativamente aos grupos em que foi administrado CCl<sub>4</sub>.

Os grupos de animais em que foi administrado CCl<sub>4</sub> demonstraram claramente sinais de perda de actividade e pelagem, fraca reacção à manipulação pelo experimentador e diminuição do consumo alimentar. Este facto é concordante com os resultados obtidos por alguns estudos indicando a perda de actividade após contacto com este tóxico (ATSDR, 2005). Contudo, tendo em conta o estado de debilidade dos ratinhos do grupo I após injeção com CCl<sub>4</sub>, ao fim de 48h de exposição. Relativamente ao grupo IV, este também não cumpriu o período de exposição, pois um ratinho morreu após 24h após a 1<sup>a</sup> injeção com extracto de *I. crithmoides* e os outros 2, passadas 24h da 2<sup>a</sup> injeção com extracto de *I. crithmoides*. Os restantes 2 ratinhos do grupo IV foram sacrificados 24h depois da 2<sup>a</sup> injeção, uma vez que demonstraram sinais de debilidade acentuados, sugerindo também que não aguentariam o período de exposição. Porém, é de referir que os ratinhos do grupo III e V, não apresentaram sinais de debilidade durante o período de exposição a *I. crithmoides*. Contudo os ratinhos do grupo V, após injeção do CCl<sub>4</sub> no último dia de exposição, apresentaram sinais de debilidade, como referido anteriormente. Estes dados confirmam que o CCl<sub>4</sub> apresentou toxicidade para os organismos, reflectindo-se no seu estado de saúde.

Relativamente aos rácios dos vários órgãos, para os diferentes tratamentos, o teste estatístico revelou diferenças significativas para o epidídimo esquerdo, entre os grupos Grupo I e II. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que o Grupo I foi tratado com CCl<sub>4</sub>, que foi usado como indutor de toxicidade. No tratamento com NaCl o rácio foi mais elevado, como previsto, tendo em conta que este grupo representa uma situação fisiológica normal e saudável, sem influência de tóxicos. Relativamente ao testículo não foram identificadas diferenças significativas.

Na literatura estão disponíveis dados de um estudo, que refere que em três gerações de ratos que inalaram vapores de tetracloreto de carbono, correspondentes a uma exposição de 200 ppm ou superior, relativamente ao peso do animal, durante 8 horas/dia, 5 dias/semana, por um período de 10,5 meses, foi observada uma diminuição da fertilidade dos animais expostos (ATSDR, 2005). O mesmo estudo refere uma moderada a acentuada degenerescência do epitélio germinativo testicular em ratos expostos repetidamente (7 horas/dia, 5 dias/semana) a concentrações iguais ou superiores a 200 ppm, durante 192 dias (ATSDR, 2005). Vários estudos permitem provar que o tetracloreto de carbono é muito útil como modelo experimental para estudo de danos hepáticos (Janakat et al., 2002; Jadon et al., 2007; Lee et al., 2008), e não tanto ao nível reprodutor. Contudo, há alguns estudos que apontam algumas alterações histopatológicas ao nível do sistema reprodutor, como libertação de células germinativas, vacuolização de

células, redução no número de espermatozóides e ainda redução no peso dos órgãos, em comparação com grupos controle entre outras (Batra et al., 2001; Cortázar et al., 2004; Jadon et al., 2006; Horn et al., 2006).

Em termos de observação histopatológica não foi feita qualquer identificação e individualização entre testículos esquerdo e direito e entre epidídimo esquerdo e direito. Após uma alteração histopatológica observa-se intensa actividade regenerativa, com mitoses e células bi- ou trinucleadas. Os núcleos são volumosos, com nucléolos evidentes, indicando elevada síntese proteica. A presença de células em degenerescência, indica algum grau de alteração, uma vez que representam núcleos necróticos. As espermatogónias e os espermatócitos primários são os principais alvos de alterações histopatológicas, por agentes tóxicos, dado que estão em constante actividade enzimática mitótica e meiótica, respectivamente (Batra et al., 2001).

As células de Sertoli<sup>2</sup> têm como principais funções o controlo da maturação e da migração das células germinativas; estão envolvidas na síntese de proteínas e esteróides, e fagocitam células germinativas em degenerescência (Dadoune e Demoulin, 1993), assim como corpos citoplasmáticos residuais libertados por espermátides adultas durante a espermatogénese (Amann, 1993). As células de Sertoli são mais afectadas por agentes químicos tóxicos do que as células germinativas mais avançadas, provavelmente porque estas substâncias passam necessariamente pela barreira-hematotesticular, antes de atingirem as células espermáticas (França e Garcia, 2005).

Segundo Russell et al (1990), o processo espermatogénico pode ser reduzido por interrupção do padrão de divisões das células tronco, degenerescência e fagocitose das células germinativas, atraso na espermatogénese e libertação das células germinativas, que podem ocorrer isoladamente ou em associação ao parênquima testicular, por carência hormonal ou efeito tóxico de substâncias químicas. Degenerescência generalizada das células germinativas, ocorrência de espermátides multinucleadas, formação de células gigantes, libertação de células germinativas do epitélio seminífero e conseqüentemente atrofia testicular são conseqüências da anomalia funcional das células de Sertoli (Russel e Griswold, 1993). De facto, observou-se vacuolização, acumulação de células imaturas no lúmen do túbulo seminífero, presença de células em degenerescência e ausência de espermatozóides nos grupos de animais em que foi administrado CCl<sub>4</sub>. Contudo no grupo V, estas alterações foram registadas em menor percentagem que nos restantes grupos em que se administrou extracto de *I. crithmoides* (Grupos I e IV).

Vários têm sido os artigos publicados na literatura especializada que se referem a alterações histomorfológicas e funcionais das células do testículo induzidas por xenobióticos<sup>3</sup>. Assim, alguns afectam o citosqueleto das células de Sertoli (Hess e Nakai 2000; Raychoudhury et al., 2000). Outros induzem a condensação da cromatina dessas células somáticas (Raychoudhury et al., 1999). Contudo, a alteração mais evidente em várias situações experimentais corresponde à vacuolização do citoplasma (Soldani et al., 1996; Contreras and Bustos-Obregon 1999), as quais estão associadas a alterações metabólicas celulares, intervindo em processos enzimáticos. Adicionalmente, a modificação da permeabilidade da barreira hemato-testicular constitui ainda um alvo de extrema importância em disfunções do testículo (Meyer et al., 1996; Wiebe et al., 2000; Mizushima et al., 2001), contudo não foi considerada neste estudo. É conhecido que os

<sup>2</sup> As células de Sertoli envolvem parcialmente as células da linhagem espermatogénica e intervêm no suporte e nutrição das células germinativas; são as coordenadoras da formação dos espermatozóides.

<sup>3</sup> Substâncias estranhas ao organismo.

efeitos tóxicos de um xenobiótico podem ser modificados por outras substâncias (Skoczyska e Smolik, 1994; Gupta e Gill, 2000). Os compostos polifenólicos presentes nas células vegetais podem ter uma acção antioxidante ao se ligarem às espécies reactivas de oxigénio, via enzimática e reacções não enzimáticas (Marja et al., 2000; Pyo et al., 2004).

Os túbulos seminíferos de ratinhos tratados com  $\text{CCl}_4$  (Grupo I), apresentam a sua morfologia normal. Contudo, foram registadas algumas alterações pontuais, nomeadamente e com maior relevância a libertação e acumulação de células germinativas no lúmen do túbulo seminífero. Estes resultados estão de acordo com os discutidos por Russel et al., 1990, anteriormente referidos. No grupo I notou-se que houve diminuição do número de espermatozóides, mas apenas dois túbulos seminíferos apresentavam total ausência de espermatozóides. Contudo, estas alterações tornam-se negligenciáveis, tendo como base os 100 túbulos seminíferos analisados de cada secção de testículo de todos os ratinhos. Os animais deste grupo tiveram apenas 48h de exposição e foram injectados com uma dose única de  $\text{CCl}_4$ . A continuação da experiencia não foi possível, tendo em conta a probabilidade de sobrevivência que sugeriam, mesmo após 24h da injeção. Contudo é de salientar o facto de que, se a experiência tivesse decorrido normalmente, provavelmente os efeitos histopatológicos alterações significativas.

Os ratinhos do grupo de controlo negativo não apresentaram qualquer alteração significativa da estrutura normal do túbulo seminífero. Mais uma vez ocorreram alterações pontuais, que apresentam menor severidade relativamente ao grupo de controlo positivo, tratado com  $\text{CCl}_4$ , tal como era esperado.

Os ratinhos do tratamento com apenas extracto de *I. crithmoides* (em NaCl 0,9%) (Grupo III) apresentaram túbulos seminíferos normais, bem delimitados, mas com alguns núcleos em provável necrose e alguns vacúolos no epitélio. Contudo, nos 100 túbulos seminíferos analisados de cada secção de testículo, não foram observadas células com libertação e acumulação de células imaturas no lúmen. Analogamente aos grupos de controlo positivo e negativo estes resultados são pouco relevantes, uma vez que representam uma minoria, tendo em conta todas as células analisadas. Apesar da irrelevância, seria interessante analisar e avaliar os compostos presentes no extracto, com posterior identificação dos compostos potencialmente nefastos para a estrutura morfológica do testículo e epidídimo.

Neste trabalho procedeu-se ao estudo do potencial protector/regenerador da planta relativamente à exposição a  $\text{CCl}_4$  através da realização de dois grupos de tratamento IV e V. Os resultados obtidos com estes tratamentos revelaram-se pouco promissores, tendo-se observado contudo algumas diferenças relativamente ao tratamento em que apenas foi administrado  $\text{CCl}_4$ : diminuição do grau de vacuolização e acumulação de células germinativas no lúmen do túbulo seminífero, bem como redução de células em degenerescência. Deve reconhecer-se que estas melhorias observadas nos tratamentos em que se administrou extracto da planta são diminutas quando comparando com os danos provocados pelo tóxico. Não se pode excluir a possibilidade de o tempo de tratamento a que os animais foram sujeitos, de apenas 5 dias de injeção com o extracto vegetal, poder ter sido curto para a observação de efeitos positivos. Também é de notar que o tratamento preventivo com extracto de *I. crithmoides* (antes da administração de  $\text{CCl}_4$  - grupo V) foi, segundo observação histopatológica, mais eficaz na reabilitação do testículo do que o tratamento curativo com extracto de *I. crithmoides* (depois da administração de  $\text{CCl}_4$  - grupo IV). Estas conclusões estão naturalmente condicionadas pela alteração do tempo de duração da exposição (devido ao estado débil dos animais, as injeções com extracto de *I. crithmoides* não cumpriram o programado) e

consequentemente não é possível avaliar, nas mesmas circunstâncias, o efeito regenerador ou protector da planta.

Além do testículo, verificaram-se também condições histopatológicas no epidídimo, que serão devidas à interligação deste com o testículo. Não foi possível comparar os resultados obtidos pela observação do epidídimo com trabalhos de outros autores, uma vez que não foi encontrada literatura que reportasse estes parâmetros. As várias secções do epidídimo demonstraram, nos vários grupos de tratamento, a ausência total ou parcial de espermatozóides na zona da cabeça do epidídimo, o que afasta a possibilidade de eventual alteração histopatológica em resposta aos diferentes tratamentos. O estudo da cabeça do epidídimo poderá ser incluído em futuros trabalhos, uma vez que é esta a região que apresenta a maior actividade de secreção de proteínas importantes para a maturação de espermatozóides (Dacheux, 2002). Apesar de não haver diferenças notórias na presença de espermatozóides, no grupo tratado com CCl<sub>4</sub> visualizaram-se mais alterações histopatológicas, nomeadamente a presença de vacúolos no epitélio colunar do epidídimo.

As secções do epidídimo do grupo II (NaCl), do grupo III (*Inula crithmoides*), do grupo IV (CCl<sub>4</sub> + *I. crithmoides*) e ainda do grupo V (*I. crithmoides* + CCl<sub>4</sub>) apresentaram, no geral, a sua estrutura normal. Algumas células do epidídimo apresentaram vacúolos, mas numa percentagem muito diminuta da secção analisada (cerca de 1-3%), enquanto o grupo de controlo positivo (CCl<sub>4</sub>) apresentava uma percentagem um pouco superior (7-9%). Estes dados sugerem que o extracto de *I. crithmoides* poderá ter algum efeito preventivo e/ou curativo, ainda que pouco esclarecedor. Para este parâmetro não foram tidos em conta valores absolutos de células alteradas, tendo apenas sido feita uma avaliação geral. Apesar da avaliação precoce, que se pode fazer ao nível do epidídimo, importa referir que o grupo pré-tratado com CCl<sub>4</sub> e depois tratado com *extracto de I. crithmoides* apresentou mais sinais de vacuolização ligeiramente superiores.

Analogamente ao verificado para o testículo, o grupo tratado com extracto de *I. crithmoides* inicialmente e depois com CCl<sub>4</sub> pareceu ter sido mais eficaz na reabilitação do epidídimo do que o grupo tratado com CCl<sub>4</sub> inicialmente e depois com extracto de *I. crithmoides*. As mesmas razões se enunciam novamente quanto ao grupo tratado com CCl<sub>4</sub> inicialmente e depois com extracto de *I. crithmoides*, uma vez que o tempo de experiência não foi o inicialmente planeado, não se podendo fazer uma avaliação precisa relativamente a este grupo.

Sugere-se, que o extracto aquoso de cipselas de *I. crithmoides* poderá apresentar propriedades potencialmente protectoras mais promissoras do que as propriedades regeneradoras. Todavia, os resultados obtidos não se podem considerar significativos, sendo proveitoso no futuro realizar novas experiências para confirmar o valor protector desta planta.



## APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Face às alterações verificadas e à determinação inconclusiva da actividade deste extracto surge a necessidade de investigar novas concentrações de CCl<sub>4</sub> que induzam efeitos adversos, possíveis de regeneração e/ou protecção pelo extracto de inflorescências no estado de frutificação de *Inula crithmoides*. Pretende-se no futuro realizar novas experiências para confirmar o valor protector desta planta, avaliando várias condições de teste, nomeadamente novas doses, diferentes tempos e modos de exposição.

Torna-se necessário, portanto, aprofundar este estudo, fazendo testes mais minuciosos e alargando o universo de órgãos estudados, prolongando os testes e englobando as glândulas anexas ao sistema reprodutor, assim como realizando análises bioquímicas. Adicionalmente, a modificação da permeabilidade da barreira hemato-testicular constitui ainda um alvo de extrema importância em disfunções do testículo, pelo que deverá ser considerada em estudos posteriores. O estudo da cabeça do epidídimo deverá também ser considerado, mas de forma mais pormenorizada, em futuros trabalhos, uma vez que, é esta a região do epidídimo que apresenta a maior actividade de secreção de proteínas importantes para a maturação de espermatozóides. É ainda aconselhável a identificação e individualização do testículo (esquerdo e direito) e epidídimo (esquerdo e direito). Seria interessante analisar e avaliar os compostos presentes no extracto, com posterior identificação dos compostos potencialmente nefastos para a estrutura morfológica e função do testículo e epidídimo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Wahhad MA, Abdel-Azim SH, El-Nekeety AA (2008). *Inula crithmoides* extract protects against ochratoxin A-induced oxidative stress, clastogenic and mutagenic alterations in male rats. *Toxicol* 52: 566-573.
- Amann RP (1993). Physiology and endocrinology. In: AO McKinnon, JL Voss (eds.), *Equine reproduction*, Lea and Febiger, Philadelphia, 658-685 pp.
- ATSDR (2005). Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. *Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride*. Georgia, U.S.A..
- Batra N, Nehru B, Bansal MP (2001). Influence of Lead and Zinc on Rat Male Reproduction at 'Biochemical and Histopathological Levels'. *Journal of Applied Toxicology* 21: 507-512.
- Contreras HR and Bustos-Obregon E (1999). Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *Journal Experimental of Zoology* 284: 355-359.
- Cortázar IC, Díez N, Fernández MG, Puche JE, Caballero FD, Quiroga J, Sánchez MD, Castilla A, Casares AD, Nieto IV, Prieto J, Barón SG (2004). Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: Effect of insulin-like growth factor 1. *World Journal Gastroenterology* 10(17): 2529-2534.
- Dacheux F (2002). Protein secretion in the epididymis. In: B Robaire, BT Hinton (eds), *The epididymis: from molecules to clinical practice*. Klumer Academy, New York, 151-168.
- Dadoune J, Demoulin A (1993). Structure and function of testis. In: Thibault C, Levasseur M, Hunter RHF (Eds), *Reproduction in mammals and man*, Ellipses, Paris, 227-250 pp.
- França LR, Garcia HC (2005). Célula de Sertoli. In: HF Carvalho, BC Buzato (eds.), *Células*, Manole, Barueri-São Paulo (ed.), Editora Manole, 302-325pp.
- Gholap S, Kar A (2003). Efficacy of Some Plant Extracts in Regulating Corticosteroid-Induced Hyperglycaemia in Mice. *Pharmaceutical Biology* 41(5): 315-318.
- Gupta V, Gill KD (2000). Influence of ethanol on lead distribution and biochemical changes in rats exposed to lead. *Alcohol* 20: 9-17.
- Hess RA, Nakai M (2000). Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histology Histopathological* 15: 207-224.
- Horn MM, Ramos AR, Winkelmann L, Matte US, Goldani HA, Silveira TR (2006). Seminiferous epithelium of rats with food restriction and carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *International Brazil Journal Urology* 32: 94-99.
- Jadon A, Bhadauria M, Shukla S (2007). Protective effect of *Terminalia bellerica* Roxb. and gallic acid against carbon tetrachloride induced damage in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 214-218.
- Janakat S, Al-Merie H (2002). Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride – induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methodos* 48: 41-44.
- Junqueira L C, Carneiro J. (2004). *Histologia Básica – Texto e Atlas*, 11ª edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 488 p.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3945-3962.

- Kamboj V.P (2000). Herbal medicine. *Current Science* 78: 35-37.
- Kobayashi T, Song QH, Hong T, Kitamura H, Cyong JC (2002). Preventative Effects of the Flowers of *Inula britannica* on Autoimmune Diabetes in C57BL/ KsJ Mice Induced by Multiple Low Doses of Streptozotocin. *Phytotherapy Research* 16: 377-382.
- Lee CH, Shih PH, Hsu CL, Yen GC (2007). Hepatoprotection of tea seed oil (*Camelia oleifera* Abel.) against CCl<sub>4</sub> – induced oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology* 45: 888-895.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Echevarria A, Grynberg NF (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica Nova* 25(3): 429-438.
- Marja PK, Anu IH, Heikki JV, Jussi-Pekka R, Kalevi P, Tytti SK, Marina H (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 47: 3945-3962.
- Meyer JM, Mezrahid P, Vignon F, Chabrier G, Reiss D, Rumpler Y (1996). Sertoli cell barrier dysfunction and spermatogenetic cycle breakdown in the human testis: a lanthanum tracer investigation. *International Journal of Andrology* 19: 190-198.
- Mizushima H, Nakamura Y, Matsumoto H, Dohi K, Matsumoto K, Shioda S, Banks WA (2001). The effect of cardiac arrest on the blood-testis barrier to albumin, tumor necrosis factor-alpha, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, sucrose, and verapamil in the mouse. *Journal of Andrology* 22: 225-260.
- Pyo YH, Lee TC, Logendra L, Rosen RT (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*) extracts. *Food Chemistry* 85: 19-26.
- Rao KS, Mishra SH (1997). Hepatoprotective activity of *Inula racemosa* root. *Fitoterapia* LXVIII: 510-514.
- Raychoudhury SS, Blake CA, Millette C F (1999). Toxic effects of octylphenol on cultures rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Toxicology applications of Pharmacology* 157: 192-202.
- Raychoudhur SS, Flowers AF, Millette CF, Finlay MF (2000). Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cultured rat Sertoli cells. *Journal of Andrology* 21: 964-973.
- Russel LD, Ettlín RA, Hikim APS, Clegg ED (1990). Histological and Histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Florida, 286 pp.
- Russel LD, Griswold MD (1993). The Sertoli cell, 1<sup>st</sup> edition. Clearwater, Florida, 801 pp.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80.
- Saygi S, Konuklugil B, Kutsal O, Uzbay T, Deniz G, Gören Z (2003). Assessment of therapeutic effect of *Inula heterolepsis* Boiss in alcoholic rats. *Phytotherapy Research* 17: 683-687.
- Shan JJ, Yang M, Ren JW (2006). Anti-diabetic and Hypolipidemic Effects of Aqueous-Extract from the Flower of *Inula japonica* in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29(3): 455-459.
- Singh A, Singh SK (2009). Evaluation of antifertility potential of Brahmi in male mouse. *Contraception* 79: 71-79.
- Skoczyska A, Smolik R (1994). The effect of combined exposure to lead and cadmium on serum lipids and lipid peroxides level in rats. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 7: 263-271.
- Soldani P, Pellegrini A, Gesi M, Lenzi P, Paparelli A (1996). Suramin-induced ultrastructural changes in the testis of albino rats. *Experimental Toxicology Pathology* 48: 299-305.
- Song QH, Kobayashi T, Iijama K, Hong T, Cyong JC (2000). Hepatoprotective Effects of *Inula britannica* on Hepatic Injury in Mice. *Phytotherapy Research* 14: 180-186.
- Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH (2000). Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *Journal of Andrology* 21: 625-635.