

VILSON TADEU ROCHA PEREIRA

EFEITOS DO ANTI-INFLAMATÓRIO ENZIMÁTICO DE ORIGEM VEGETAL
ESCINA (REPARIL), SOBRE O TESTÍCULO E EPIDÍDIMO DE
CAMUNDONGOS E SUA INTERAÇÃO COM A TESTOSTERONA

*Este exemplar foi
devidamente corrigido
conforme resolução CCFG/036/93
Piracicaba 09/10/93
A. Guimarães*

TESE APRESENTADA A FACULDADE
DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS,
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM CIÊNCIAS, NA ÁREA DE FISIOLOGIA
E BIOFÍSICA DO SISTEMA ESTOMATOG-
NÁTICO.

ORIENTADOR: PROF. DR. ALCIDES GUIMARÃES

P414e

18232/BC

PIRACICABA - SP

1992

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ágrededo primeiramente à Deus pela dádiva
da vida e pela companhia em todos os momentos,
me fortalecendo, para que este trabalho se
tornasse realidade.

Aos meus pais pelo amor, compreensão
e amparo que me proporcionaram essa
oportunidade.

Ao meu irmão pelo incentivo
e carinho sempre presentes.

dedico este trabalho.

Agradeço de uma forma especial ao PROF. DR. ALCIDES
GUIMARÃES, pela amizade, compreensão e atenção
demonstradas durante a nossa vida acadêmica e
incentivo na orientação e execução deste trabalho,
inesquecível em todos os sentidos.

Ao PROF. DR. DÉCIO TEIXEIRA pela oportunidade,
colaboração e estímulo não só no transcorrer do
curso como também na nossa pesquisa que nos
proporcionou galgar mais um degrau de nossa vida
profissional.

Ao PROF. DR. JOÃO LEONEL JOSÉ por ter participado
efetivamente de todos os momentos decisivos,
demonstrando sempre carinho, amizade e atenção
indispensáveis para a conclusão de mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Dias Sobrinho, pela atenção e incentivo aos cursos de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Renato Roberto Biral, pelo trabalho e dedicação à esta Faculdade.

Ao Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, pelo apoio e disposição aos alunos dos cursos de Pós-Graduação.

À Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, Assistente da Disciplina de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas, da FDP, pela amizade, carinho e colaboração sempre presentes.

Ao Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis, Chefe do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração na execução das fotomicrografias e análise dos resultados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Moustafa Mohamed El-Guindy, Titular da Disciplina de Bioquímica da FOP pelo incentivo e atenção no decorrer de nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mario Roberto Uizioli, Titular da Área de Patologia, da FOP, pela revisão gramatical e ortográfica deste trabalho.

Aos senhores Carlos Alberto Aparecido Feliciano e Paulo do Amaral pelo apoio técnico e boa vontade.

À senhora Shirley Rosana Sbravatti Moreto pela atenção e carinho nos serviços datilográficos.

Ao amigo Sérgio Armando Rensi sempre presente em todos os momentos.

Ao amigo Joel Vieira da Silva pela compreensão, atenção e colaboração.

À todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

CONTÉUDO

CAPÍTULO_I

1. REVISTA DA LITERATURA 01

CAPÍTULO_II

2. PROPOSIÇÃO 11

CAPÍTULO_III

3. MATERIAL E MÉTODOS 12

CAPÍTULO_IV

4. RESULTADOS 15

CAPÍTULO_V

5. DISCUSSÃO 26

CAPÍTULO_VI

6. CONCLUSÕES 32

CAPÍTULO_VII

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

CAPÍTULO_VIII

8. RESUMO 37

CAPÍTULO I

1. REVISTA DA LITERATURA

1. REVISIA DA LITERATURA

A escina é encontrada no comércio sob a denominação de Reparil.

A escina do Reparil é uma substância de origem natural, extraída do *Aesculus Hippocastanum* (Castanha da Índia), com uma estrutura bem definida, constituindo, assim, um princípio ativo puro.

A escina é encontrada no comércio, sob duas formas: a amorfizada, que apresenta elevada solubilidade, garantindo boa absorção por via oral e a liofilizada, constituída por escinato de sódio (a 5mg de escina) utilizada, exclusivamente, por via endovenosa.

Na forma amorfizada (escina amorfa - 20mg e excipiente q.s.p. 1 drágea) a posologia inicial é de 2 drágeas, 3 vezes ao dia, seguida da dose de manutenção (1 a 2 drágeas, 2 vezes/dia).

Na forma liofilizada (escinato de sódio, 5,1 mg dissolvido em 5 ml de NaCl 0,85%) a posologia indica, para adultos, 1 a 2 ampolas ao dia, via endovenosa e para crianças até 3 anos, 0,1 mg/kg de peso corporal, sendo o dobro para crianças até 10 anos, pela mesma via.

Quimicamente, a escina é uma mistura de glucosídeos e rhaminosídeos. é uma saponina ou seja, se caracteriza pela solubilidade em água, formando abundante e duradoura espuma.

Sua principal ação é caracterizada pela constrição capilar, inibindo os processos de transudação dos líquidos do exsudato inicial da inflamação, sendo considerada um anti-inflamatório enzimático de

origem vegetal.

A absorção pelo trato gastrointestinal é pequena e a excreção ocorre através da bilis (2/3) e da urina (1/3) (LANG e MENNICKE, 1972).

Em 1960, VOGEL e UEBEL observaram que a saponina contida na semente da Castanha da Índia inibia a exsudação durante o processo inflamatório provocado por corpos estranhos. Da mesma forma, induzia à redução da tumefação inflamatória em reações teciduais anafiláticas. Verificaram também que, para a efetividade da droga, havia a necessidade de uma perfeita função do córtex da supra-renal, ou seja, a escina se torna efetiva apenas em um metabolismo celular que esteja sob influência de agentes do córtex supra-renal. Segundo os autores, a substância não é um agente modificador inespecífico e nem um antiflogístico. Seus principais locais de ação são nas reações teciduais, acompanhadas por exsudação serosa.

As alterações teciduais que ocorrem após a aplicação endovenosa de escina são dependentes, principalmente, da extensão da hemólise (UEBEL e PATT, 1960). Esses pesquisadores demonstraram que a aplicação endovenosa de altas doses de escina (DL-50) provocava, em coelhos, cobaias e ratos, um envenenamento agudo, em consequência da anóxia, ou mesmo, hipóxia dos órgãos parenquimatosos essenciais, causadas por uma acentuada hemólise, resultando em consequências fatais.

Quando administraram 1/5 da DL-50 por dia (1,1mg de escina/kg de peso corporal), durante 30 dias, via endovenosa, em coelhos, verificaram que a escina não induzia alterações clínicas de consequências fatais. As alterações dos órgãos parenquimatosos, como

aquelas encontradas no envenenamento agudo, não foram observadas. Porém, a eritropoiese foi, consideravelmente, estimulada em consequência de hemólises menores.

Embora o uso medicinal da Castanha da Índia tenha sido relatado há muito tempo (VEVEY, 1900), apenas recentemente é que foram realizados estudos mais completos a respeito das propriedades específicas do seu extrato.

Assim, EVERSMAN em 1960, empregou a escina (Reparil) em ampolas, em 140 pacientes com edemas na região buco-maxilo-facial, e após o período crítico, em drágeas (10 a 20 mg/dia) durante 4 a 5 dias. Observou a remissão dos mesmos. Dos 140 pacientes tratados, apenas 1 apresentou exantema alérgico e, outro, forte sensação de vômitos.

Demonstrou-se também que o extrato de escina era muito benéfico em situações de trauma ou edema cerebral, e em casos em que um edema agudo representava um problema maior, assim como em outras situações onde a permeabilidade capilar estava aumentada (GIRERD e cols., 1961). Esses autores demonstraram, em testes de edema de pata de rato, um efeito marcante da escina, que atingiu o pico 16 horas após a administração endovenosa. Esse efeito caracterizou-se por uma significativa inibição do edema agudo. Quando aumentou-se a dosagem da escina, começaram a surgir sintomas de toxicidade evidenciados por desidratação e morte dos animais (dano renal e necrose cortical).

Realizando outros tipos de testes, tais como: reação anafilática, bolinhas de algodão e permeabilidade capilar, os autores concluíram que: 1) a escina foi capaz de inibir completamente a reação anafilática; 2) a substância foi efetiva na prevenção do aumento da

permeabilidade vascular causada pela injeção de ovoalbumina, e 3) no teste das bolinhas de algodão, a escina administrada endovenosamente não teve uma atividade significativa; quando injetada subcutaneamente, mostrou ser um potente irritante tecidual local.

SIERING (1962) demonstrou trocas estruturais em células do carcinoma ascítico de ratos (tumor de Ehrlich), sob influência da escina. Numa primeira fase, ocorria diminuição das células, com perda de potássio e, na segunda fase, um aumento das mesmas, em decorrência da entrada de sódio. Havia, portanto, uma alteração do equilíbrio potássio/sódio pela ação da escina, com quociente favorável ao potássio. Não foi observada nenhuma citólise, porém, as células tumorais ficaram em estado de pré-lise. Essas alterações no transporte de íons parecem ser uma característica das saponinas, que se concentram na superfície das células e reduzem a tensão superficial das mesmas.

VOGEL e MAREK (1962) realizaram, em ratos, um estudo comparativo entre diferentes saponinas (saponina do *Aesculus hippocastanum*, saponina da *Gypsophila paniculata*, saponina do *Cyclamen europaeum*, saponina de *Agrostemma githago*, saponina de *Hedera helix* e digitonina) e concluíram que apenas a saponina do *Aesculus hippocastanum* (escina) mostrou efeitos anti-exsudativos. Esses efeitos foram evidentes tanto no momento em que a substância foi administrada profilaticamente (16 horas antes de se provocar o edema), como no tratamento do edema já estabelecido. Evidenciou-se o efeito pela remoção acelerada do fluido, indicando um sinal de atividade antiflogística, fato não ocorrido com as outras saponinas estudadas.

Os autores também observaram efeitos diuréticos e natriuréticos da escina, em ratos normais bem como em animais hipofisectomizados. Descreveram ainda que a escina é transportada no organismo, quimicamente ligada às proteínas plasmáticas e, que na ausência destas, ela liga-se ao colesterol numa proporção molar de 1:1. As outras saponinas ligam-se, exclusivamente, à albumina.

A respeito do mecanismo de ação da escina, VOGEL, MAREK e STOECKERT (1969) formularam algumas hipóteses baseados em experimentos realizados com ratos pré-tratados ou não, com a substância.

Segundo os autores: 1) a escina alterou a permeabilidade celular, resultando num influxo reduzido em meio hipotônico ou numa eliminação mais rápida do fluxo, através da transferência para o meio isotônico; 2) a escina causou excreção de fluido edematoso, através do aumento de fluxo, e 3) a ação da escina foi anti-exsudativa, pela antagonização de substâncias flogísticas, ao contrário da histamina ou serotonina.

AICHINGER, GISS e VOGEL (1964), analisando a ação da escina e do glicosídeo flavone (de frutas cítricas) verificaram que o primeiro inibia a excreção de água pelos capilares e o segundo, impedia a penetração de macromoléculas na parede capilar. Utilizando-se o preparado Veno-Reparil, que contém esses 2 princípios ativos, a administração oral a 251 pacientes com varicose, 235 com úlcera cruris e 83 com tromboflebite, descreveram que os resultados foram subjetivamente bons e objetivamente, muito bons. O edema foi rapidamente dispersado, a formação de novo edema foi prevenido e, foi exercido um efeito antiflogístico nos processos inflamatórios. Não se verificou incompatibilidade em nenhum caso.

Em 1968, TORELLI injetou através de perfusão venosa, 5,0 mg/dia de escinato de sódio em 200 pacientes com indicação para intubação oro-traqueal o que, inevitavelmente, provoca edema de laringe e observou, imediatamente à extubação, uma moderada e difusa hiperemia da mucosa laringo-traqueal, e um pequeno edema hipoglótico que, em 75% dos casos, 24 horas após, já apresentava aspecto normal. TORELLI concluiu que os resultados, do ponto de vista clínico e anatomopatológico, foram excelentes.

Estudando a ação antiflogística da escina, "in vivo" e "in vitro" (cultura de eritroblastos), MAGLIULO e cols. (1968) verificaram que a substância induzia a uma diminuição da celularidade do exsudato, especialmente em relação ao número de macrófagos, não ocorrendo alteração na velocidade de locomoção e índice fagocítico das células inflamatórias. Sobre os eritroblastos, "in vitro", observaram que a escina não apresentou efeitos indesejados na medula óssea.

Visando elucidar o mecanismo de ação da escina, VOGEL, MAREK e DETNER (1970) realizaram testes em vários modelos de inflamação: edema de pata de rato seguinte à aplicação local de ovoalbumina, dextrano, hialuronidase, bradicinina, serotonina, histamina, aerosil, caolim, formalina e edema de Arthus. Um efeito inibitório foi observado nesses edemas, representando pela fase inicial da exsudação. Houve inibição do edema induzido por ovoalbumina dextrano, bradicinina e reação de Arthus. Nos outros tipos, o efeito se arrastou por um longo período.

Por outro lado, a escina manifestou-se ineficaz em processos de reparação tecidual. Os mesmos autores elaboraram a hipótese que a escina tem efeito sobre a redução do número e/ou diâmetro do poros das paredes capilares. Outras duas observações foram feitas também pelos autores: a primeira de que a escina, em altas doses, provoca a morte devido à maciça hemólise; a segunda de que a escina, quando administrada em doses baixas, porém por longos períodos, apresenta toxicidade crônica, induzindo à morte os animais.

LOCKS (1974) verificou que a escina em altas concentrações provocou, em bovinos e humanos, uma contração lenta e irreversível das veias. Em 1975, HEFTI e KAPPELER, estudando a eficácia em pacientes que haviam sofrido fraturas e em outros que tiveram remoção de meniscos, confirmaram a eficiência profilática e terapêutica da droga, constatadas pela inibição do edema localizado. Determinaram também, em todos os pacientes (36) a diferença de temperatura corporal no lado doente e no lado normal. No grupo tratado com escina, a temperatura foi consideravelmente menor no lado doente, o que indicou um efeito anti-inflamatório da mesma.

Estudos sobre a ação da escina sobre a fertilidade de ratos foram realizados por KREYBIG e PRECHTEL (1977). Em um grupo de 20 ratos, com 2 a 3 meses de idade, administraram, durante 7 dias, doses de 1,0 a 20 mg/kg de escinato de sódio, via intraperitoneal. Os animais sobreviventes (a DL-50 da escina é de 17 mg/kg) foram sacrificados e os testículos submetidos à verificação histológica. Em outro grupo, também de 20 animais, com 32 dias de idade, 10 deles receberam, no 32º e 33º dias de vida, 5,0 mg de escina, via intraperitoneal. Os outros 10 ratos serviram como controle. Houve um

acompanhamento do peso dos animais por 64 dias. A seguir, os ratos foram sacrificados e os testículos removidos para análise histológica. O esperma do canal deferente e dos testículos foi retirado e examinado em solução isotônica.

Verificaram os autores que, 3 a 5 minutos após a aplicação de altas doses, já foram reconhecidos sintomas de reação tóxica (cavidade abdominal retraída, motilidade descoordenada e dificuldades respiratórias); 15 a 20 minutos mais tarde, decúbito lateral e falta de ar e, finalmente, entre 7 e 96 horas, sobreveio a morte dos animais. Nos sobreviventes (doses entre 5,0 e 10,0 mg/kg) os espermatozóides dos ductos e dos testículos tinham motilidade regular, e as estruturas testiculares estavam normais. Foram encontradas várias partições mitóticas das espermatogônias e também meioses dos espermatócitos.

Quanto ao segundo grupo, houve um atraso no desenvolvimento das gônadas e inibição do crescimento, que mostraram-se recuperados 6 dias após a segunda administração de 5,0 mg/kg de escina. A motilidade dos espermatozóides era normal, bem como estavam normais as células intersticiais e as de Leydig. Mitoses, meioses e quantidade de espermatozóides férteis eram semelhantes ao grupo controle.

MINGRINO e SCANARINI (1978), administrando 40 mg de escina a 16 pacientes com neoplasia supratentorial e hipertensão intracranial, demonstraram uma significativa redução da pressão intraventricular e também uma diminuição de episódios de pressão alta, com o efeito da hipotensão iniciando-se já aos 3 a 4 minutos da aplicação endovenosa.

GOLDENBERG (1979) empregando a escina, no tratamento

preventivo dos edemas em cirurgia oral menor (sisos inclusos) e em cirurgias buco-maxilo-faciais (lesões traumáticas da face, afundamento de malar, luxações da A.T.M. e deformidades como prognatismo e micrognatismo) preconizou o uso, no pré-operatório imediato, de uma ampola de 5 mg, via endovenosa completando-se a terapêutica com 1 drágea de 20 mg cada 6 horas, durante 3 dias. Segundo o autor a escina, empregada tanto na forma liofilizada (ampola) como em sua forma amorfa (drágeas), elimina os edemas pós-operatórios e acelera o processo curativo ou cicatricial. Descreveu que a substância, além de sua ação antiedematosa, possui ação antiflogística e fibrinolítica.

Após infusão de 12,5 a 50,0 mg/kg/min de prostaglandina (PGE 1) na artéria femoral de coelhos, ocorreu aumento do fluxo de linfa da ordem de 13% a 81% (ROTHKOPF-ISCHEBECK e VOGEL, 1980). Doses endovenosas de escina (0,25 a 0,80 mg/kg) ou indometacina (2,5 a 20,0 mg/kg) reduziram esse fluxo linfático aumentado, em 45% a 92% e em 13% a 68%, respectivamente. A dose efetiva de escina foi de 0,29 mg/kg e de indometacina, de 3,4 mg/kg. De acordo com os resultados, tanto a escina como a indometacina tiveram efeitos antagônicos sobre o aumento da permeabilidade da barreira plasma-linfa, induzida pela PGE 1.

Realizando um estudo comparativo dos anti-inflamatórios de origem vegetal (bromelina, escina e papaina) em ratos que sofreram fraturas de mandíbula na região incisal, ARAUZ (1982) demonstrou que todos os anti-inflamatórios aceleraram o processo de reparação, sendo que o tempo de recuperação dos animais tratados com bromelina e escina é menor que os tratados com papaina.

Por outro lado, SILVA e cols. (1985) verificaram que esses mesmos anti-inflamatórios (bromelina, escina e papaina) quando

administrados em doses terapêuticas a ratos, no período compreendido desde o nascimento até a maturidade óssea, causaram redução e deformação da coluna vertebral.

De igual modo, BUSATO (1985), estudando os efeitos dos mesmos anti-inflamatórios citados acima, verificou que os filhotes de mães que receberam as substâncias durante toda a prenhez, apresentaram redução significativa nas medidas efetuadas no crânio (comprimento total, largura e comprimento da face).

CAPÍTULO II

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

Tendo em vista o observado na Revista da Literatura sobre os efeitos da Escina, anti-inflamatório enzimático de origem vegetal, propõe-se neste trabalho:

1. Analisar histologicamente os efeitos da Escina sobre o testículo e o epidídimo de camundongos.

2. Verificar os efeitos da testosterona sobre possíveis alterações provocadas pela Escina, nos testículos e epidídimos dos animais estudados.

CAPÍTULO III

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados 50 camundongos machos (*Mus musculus albinus*) com 30 a 45 dias de idade e peso aproximado de 35 a 45g no início do experimento. Os animais foram alimentados durante o período experimental com ração balanceada padrão e água "ad libitum" e mantidos em temperatura ambiente.

GRUPOS EXPERIMENTAIS (Tab. 1):

Os animais foram distribuídos casualmente em 3 grupos experimentais:

GRUPO I: CONTROLE: Constituído por 10 camundongos os quais receberam diariamente, por um período de 20 dias via intra-peritoneal, solução de NaCl a 0,9%.

GRUPO II: ESCINA: Constituído por 20 animais, redistribuídos em 2 (dois) sub-grupos, IIa e IIb, com 10 camundongos cada.

Nos animais do subgrupo IIa foi administrada uma dose diária de Escina, durante 20 dias, via intraperitoneal, na concentração de 1,71 mg/kg de peso corporal. Os animais do subgrupo IIb, receberam, pelo mesmo período de tempo e pela mesma via, doses de Escina na concentração de 3,42 mg/kg de peso corporal.

GRUPO III: ESCINA + TESTOSTERONA: Também constituído por 20 animais, redistribuídos em 2 (dois) sub-grupos, IIIa e IIIb, com 10 camundongos cada.

Os camundongos do sub-grupo IIIa receberam, à semelhança dos grupos anteriores, relativo a período experimental e via de administração, doses de Escina (1,71 mg/kg de peso corporal) e doses de testosterona na concentração de 2,0 mg/kg de peso.

Os camundongos do sub-grupo IIIb, receberam, pelo mesmo período experimental e pela mesma via, doses de Escina (3,42 mg/kg de peso) e de testosterona (4,0 mg/kg de peso).

TABELA_1: Distribuição dos animais nos Grupos Experimentais.

		DOSES ADMINISTRADAS		
GRUPOS	SUB-GRUPOS	NaCL	ESCINA	TESTOSTERONA
I		0,9%		
II	IIa		1,71 mg/kg	
	IIb		3,42 mg/kg	
III	IIIa		1,71 mg/kg	2,0 mg/kg
	IIIb		3,42 mg/kg	4,0 mg/kg

Os animais de todos os grupos experimentais foram sacrificados 5 dias após o período experimental e retirou-se o testículo e o epidídimo para análises histológicas.

As peças foram fixadas em Bouin por um período de 24 horas, desidratadas, incluídas em parafina, preparadas em lâminas, coradas em H.E. e, posteriormente, analisadas em microscópio ótico.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

A análise histológica do material dos diferentes grupos experimentais revela o seguinte:

GRUPO_1 - CONTROLE - animais injetados com soro fisiológico.

O testículo apresenta-se com os túbulos seminíferos cortados em diferentes planos. O diâmetro e o conteúdo tubulares estão, aparentemente, normais. O epitélio germinativo exibe as associações celulares características de um estadiamento também com aparente normalidade, onde destacam-se os estádios, 1, 7/8 e 12 (Figura 1) e o conjunto deles é sinal indicativo de espermatogênese normal.

O tecido intersticial está formado predominantemente por células poligonais ou globosas grandes, com núcleo entre esférico e o ovalado, e estrutura cromatínica frouxa. O citoplasma apresenta-se vesiculoso e acidófilo como o é em células secretoras de hormônios esteróides (Figura 1).

Os aspectos acima descritos são sugestivos de células normais e de elementos esteroidogênicos em atividade.

O epidídimo apresenta-se normal e com a organização parietal própria da espécie. Os túbulos epididimários encontram-se repletos de espermatozóides, resultantes do acúmulo de uma produção normal (Figura 2).

GRUPO_II - SUB-GRUPO_IIa - ESCINA - animais injetados com Escina (Reparil(A)) em dose terapêutica.

Como o grupo controle, neste lote os testículos revelam à microscopia, túbulos seminíferos corados em diferentes planos. Os caracteres histológicos variam desde aspectos de aparente normalidade e estadiamento compatível com o descrito para o Grupo I a diferentes graus de alterações.

Observam-se túbulos com atrofia aparente (de pequeno diâmetro) e com a diferenciação celular chegando apenas a espermatócito primário ou cito I (Figura 3). Nota-se também, aqui e ali, espermatídes bi e multinucleadas (Figura 4) em descamação. O material revela também túbulos seminíferos com massas grandes, de estrutura amorfa e hipercromáticas, sugerindo restos celulares ou células em degeneração (Figura 5).

O tecido intersticial, cujas características são idênticas às descritas para o grupo anterior, está aparentemente normal.

Os túbulos epididimários estão igualmente normais e com massas de espermatozoides.

GRUPO_II - SUB-GRUPO_IIb - ESCINA - animais injetados com Escina (Reparil(A)) em dose duas vezes maior que a dose terapêutica.

Embora este grupo tenha apresentado um animal cujos testículos e epidídimos apresentaram os aspectos de aparente normalidade, a característica dos demais representantes do grupo é a atrofia tubular severa.

Em alguns animais, o processo atrófico se instalou em uns poucos túbulos, com a maioria deles aparentemente preservados. Em

outros animais o processo degenerativo atingiu a quase totalidade dos túbulos. A atrofia é tubular (diâmetro pequeno) ou do epitélio germinativo, caracterizada pela ectasia luminal e desaparecimento das células epiteliais (às vezes, foram destruídas somente as células germinativas e outras vezes, até as células de sustentação desapareceram), restando somente a parede tubular (Figura 6).

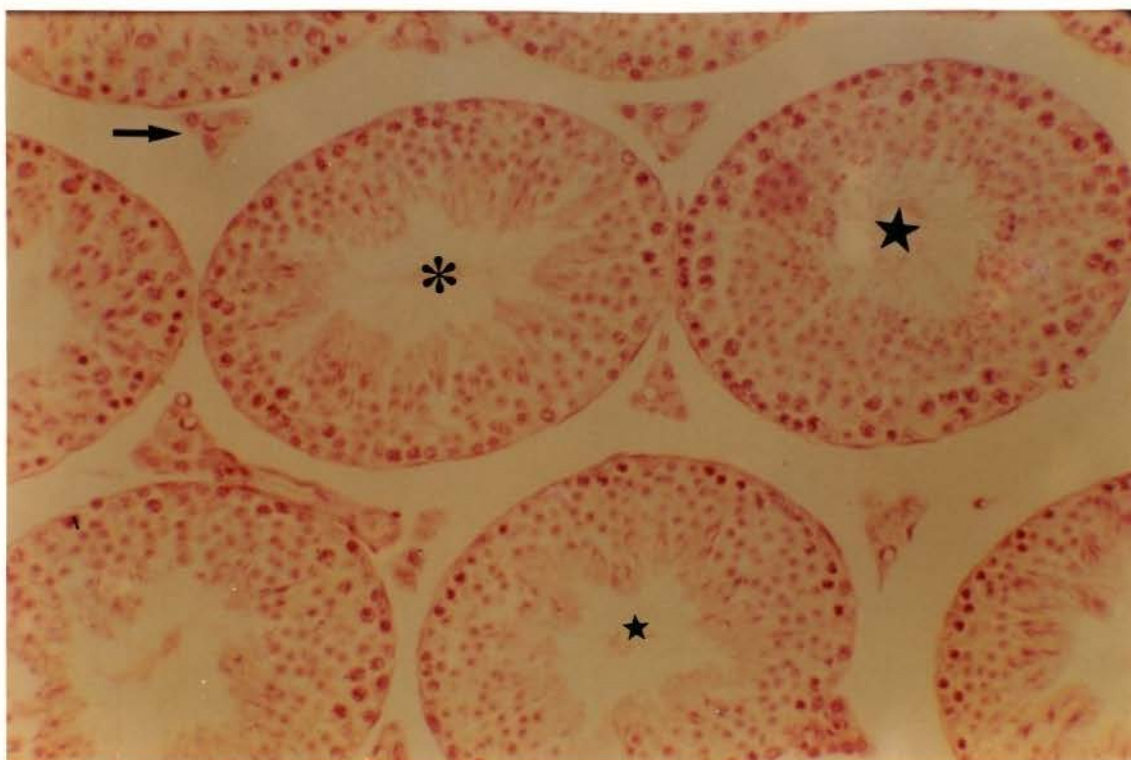
No lúmen tubular notou-se células imaturas descamadas.

GRUPO III - SUB-GRUPO IIIa - ESCINA + TESTOSTERONA -
animais injetados com Escina (Reparil) e testosterona em doses terapêuticas.

Embora tenham sido detectados dois animais exibindo túbulos com sinais aparentes de atrofia, o aspecto que predomina é o da normalidade quanto ao diâmetro e celularidade da espermatogênese (Figura 7).

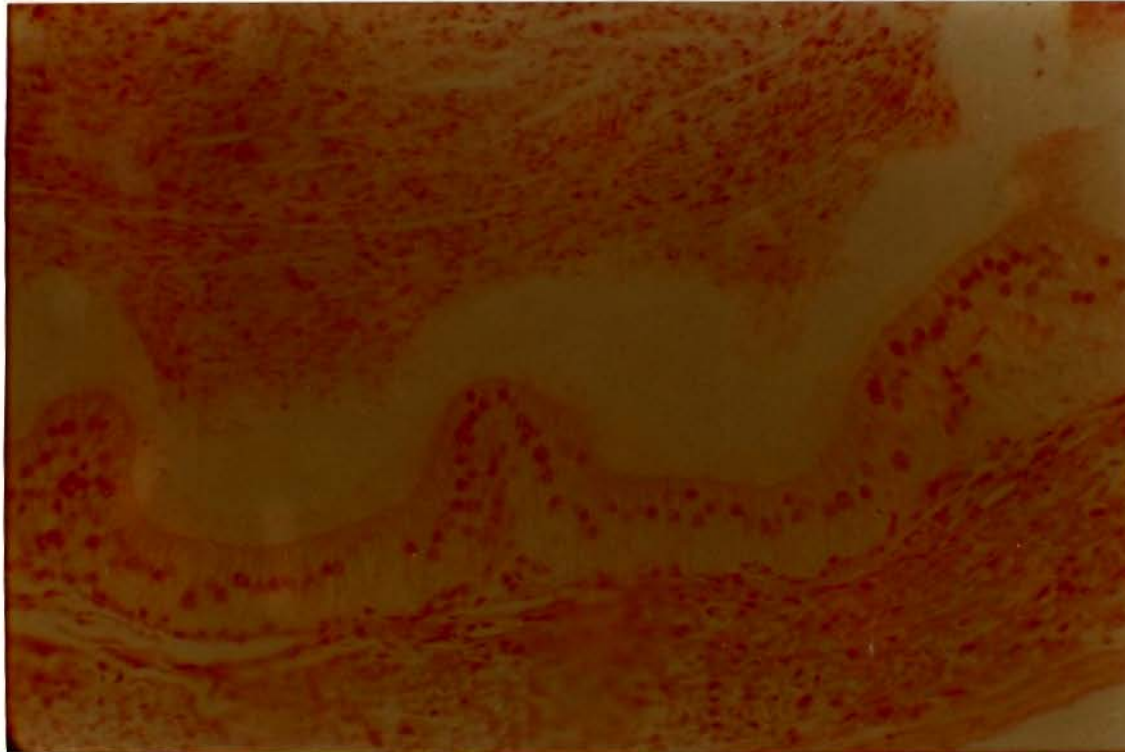
GRUPO III - SUB-GRUPO IIIb - ESCINA + TESTOSTERONA -
animais injetados com Escina (Reparil) e testosterona em doses duas vezes maior que a terapêutica.

Neste sub-grupo, como no anterior, constatou-se animais (dois) com túbulos evidenciando uma atrofia aparente, contudo, o aspecto que a destaca é o da normalidade com sugestão de celularidade aumentada, o que pode ser reflexo da dosagem de testosterona utilizada no tratamento do grupo (Figura 8).

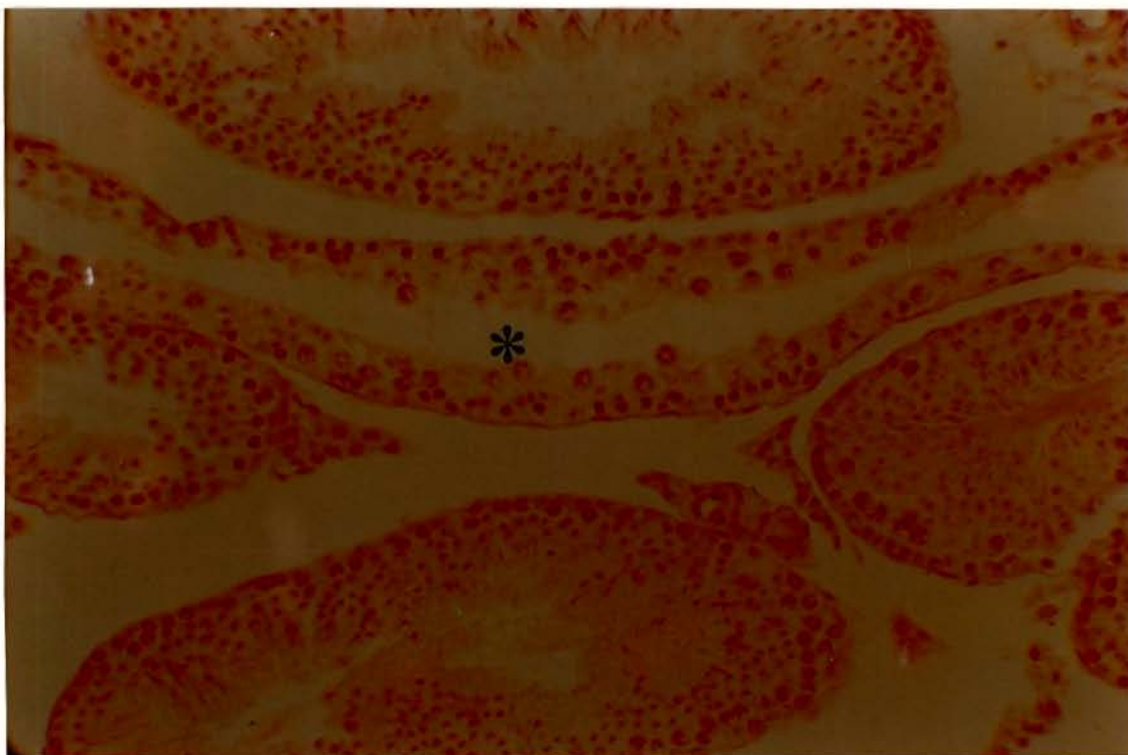


FIGURA__1 - Fotomicrografia de testículo de camundongo. Observam-se túbulos seminíferos nos estádios 1 (asterísco), 7/8 (estrêla grande) e 12 (estrêla pequena). Notam-se as células intersticiais (seta).

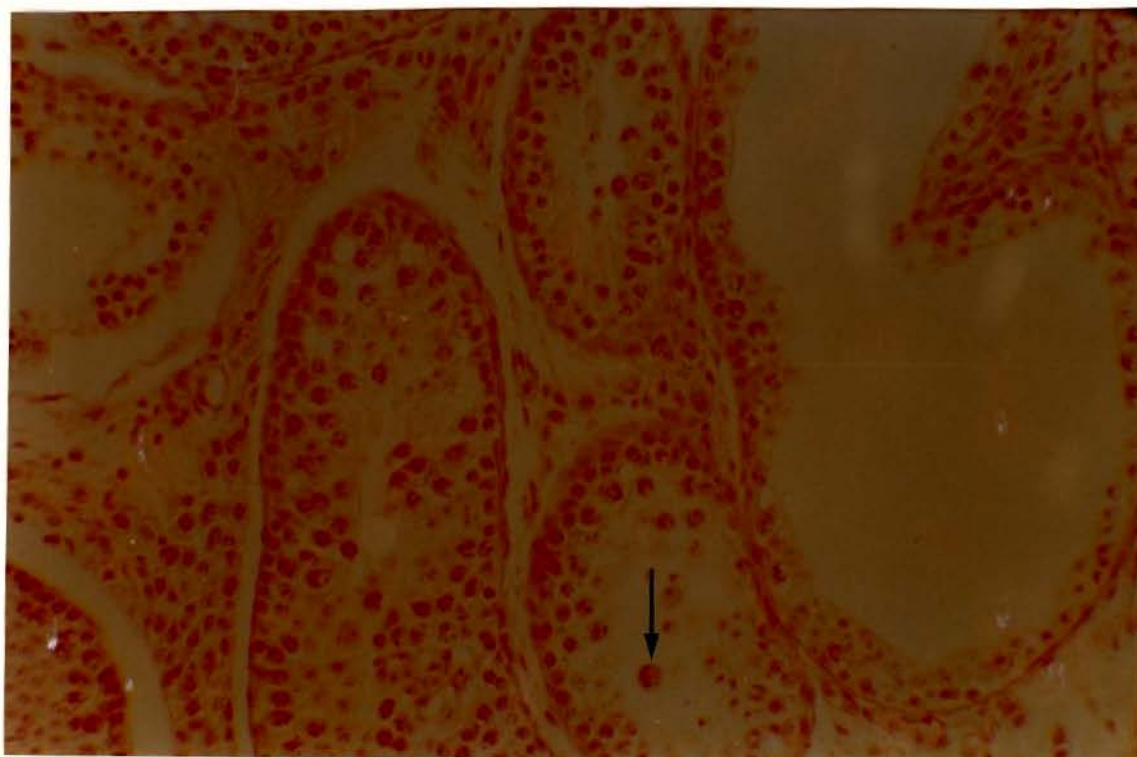
Fixador: Boiun; Coloração: H.E.; Aumento: 256x.



FIGURA_2 - Fotomicrografia de epidídimo de camundongo.
Observa-se a massa central de espermatozoides.
Fixador: Bouin; Coloração: H.E.; Aumento: 100x.



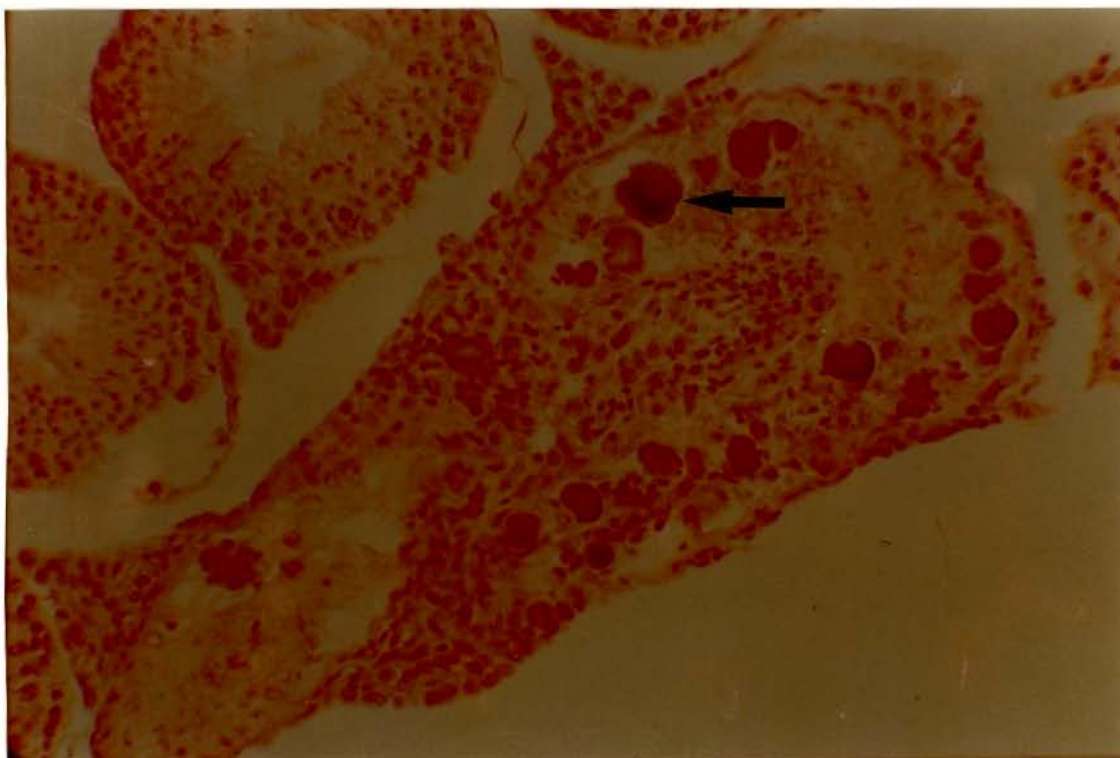
FIGURA_3 - Fotomicrografia de testículo de camundongo.
Observa-se túbulo em corte longitudinal com
espermatogênese até cito I (asterísco).
Fixador: Bouin; Coloração: H.E.; Aumento: 256x.



FIGURA_4 - Fotomicrografia de testículo de camundongo.

Nota-se no lúmen tubular uma espermátide multinucleada (seta).

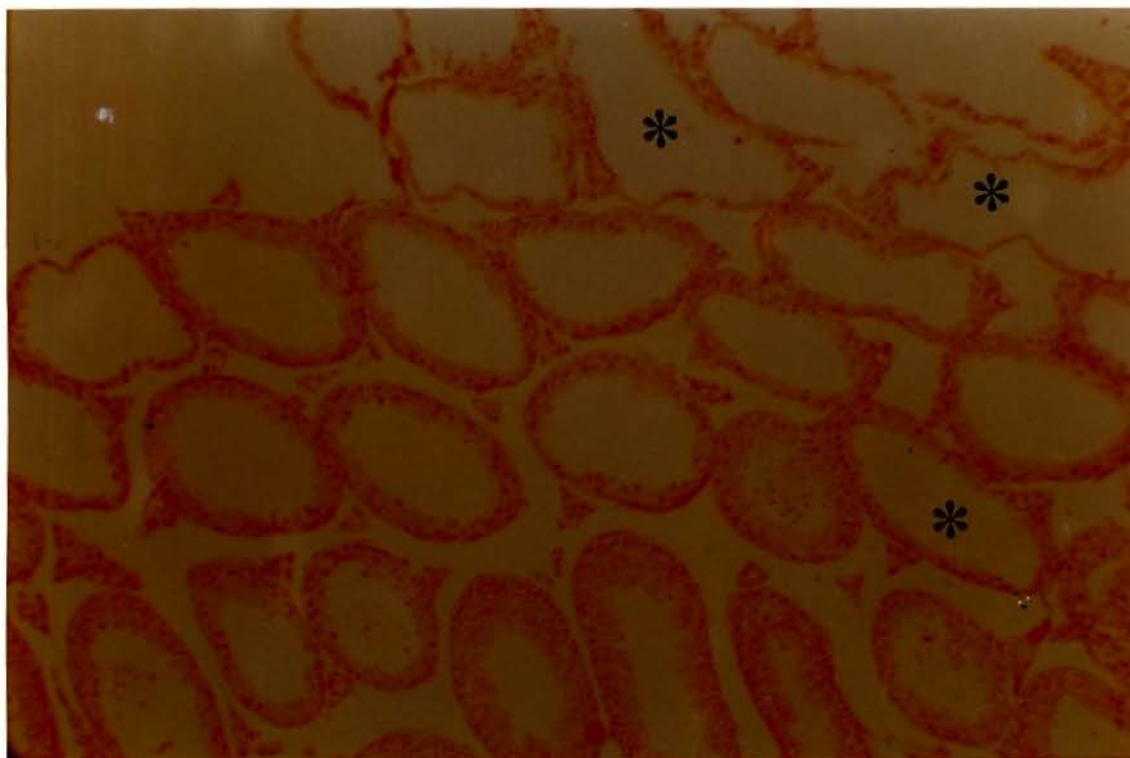
Fixador: Bouin; Coloração: H.E.; Aumento: 100x.



FIGURA_5 - Fotomicrografia de testículo de camundongo.

Nota-se a presença de grandes massas amorfas e hiper Cromáticas (seta).

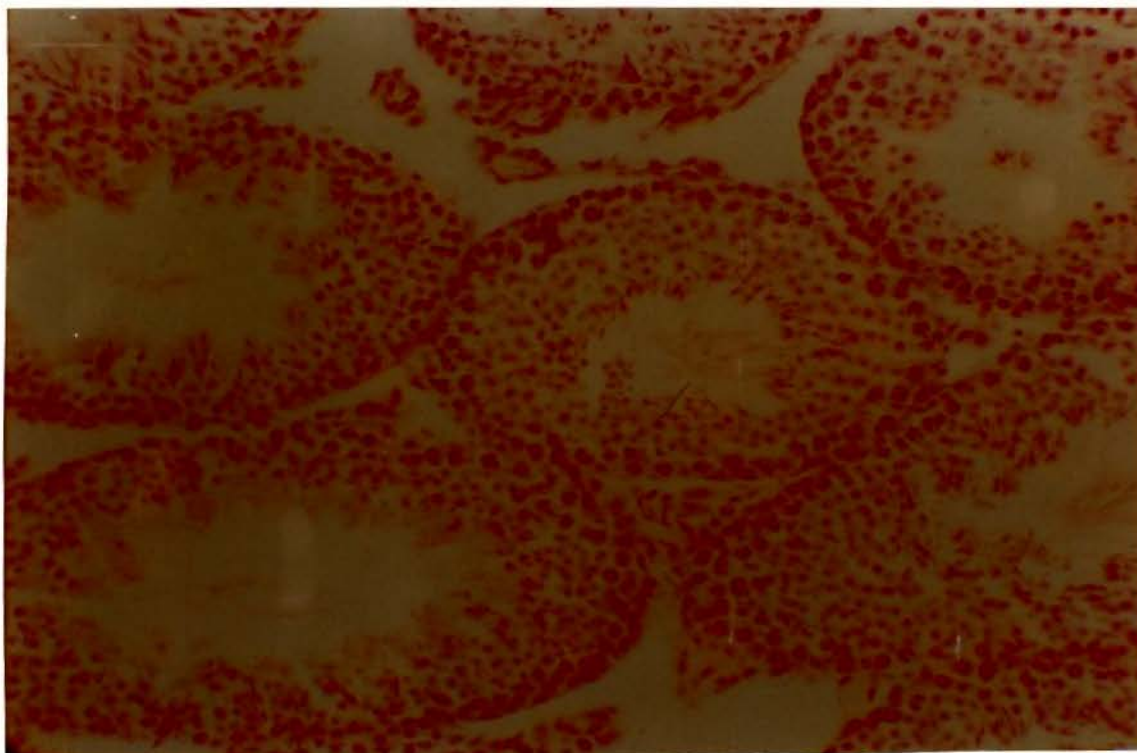
Fixador: Bouin; Coloração: H.E.; Aumento: 256x.



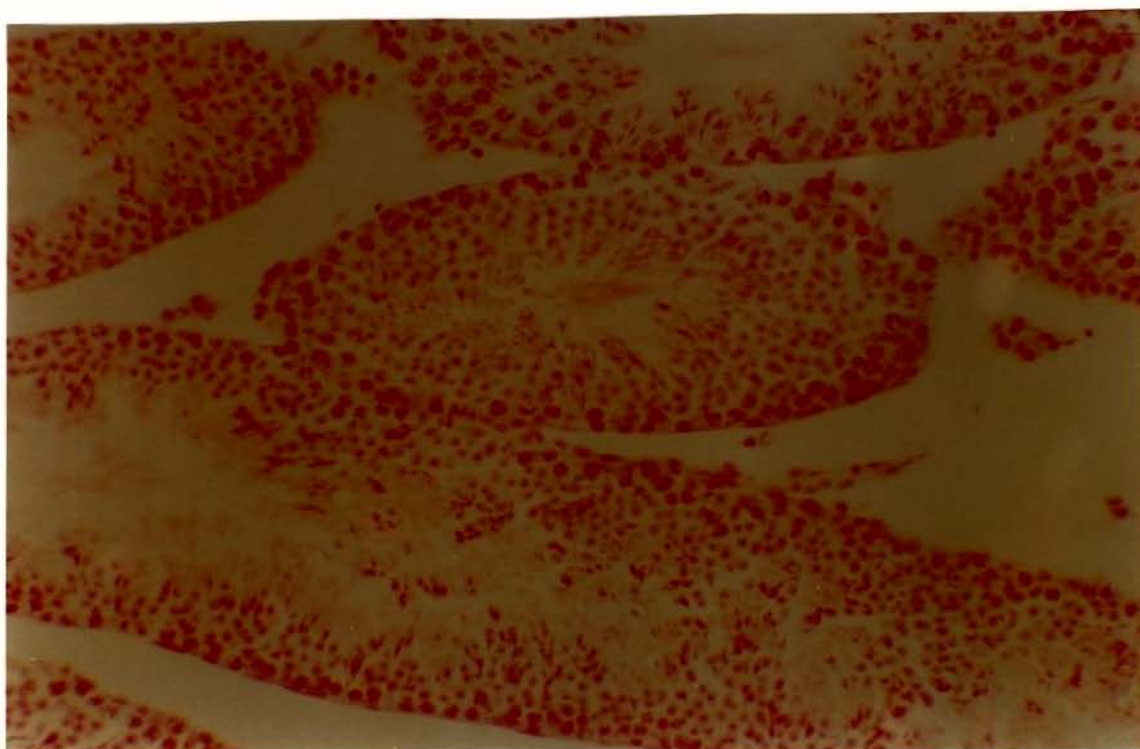
FIGURA_6 - Fotomicrografia do testículo de camundongo.

Observam-se túbulos seminíferos atrofiados onde se destacam a ectasia luminal e a destruição do epitélio germinativo (asterísco).

Fixador: Bouin; Coloração: H.E.; Aumento: 100x.



FIGURA_2 - Fotomicrografia do testículo de camundongo.
Notam-se túbulos seminíferos com celularidade e
estadiamento compatíveis com a normalidade.
Fixador: Bouin; Coloração: H.E.; Aumento: 256x.



FIGURA_8 - Fotomicrografia do testículo de camundongo.
Notam-se túbulos seminíferos com celularidade e
estadiamento compatíveis com a normalidade.
Fixador: Bouin; Coloração: H.E.; Aumento: 256x.

CAPÍTULO V

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A espermatogênese é um evento temporal onde a espermatogônia, célula indiferenciada, lentamente, por intermédio de um desenvolvimento cíclico, evolue para espermatozóide, célula altamente especializada. Além disso, ao mesmo tempo que se dá diferenciação celular, o processo permite que ocorra a renovação e a expansão da espermatogônia indiferenciada. Tanto a diferenciação celular, como a renovação e expansão da célula mãe são componentes cronológicos e fundamentais da espermatogênese (HUCKINS, 1983).

A gametogênese masculina está confinada ao interior dos túbulos seminíferos, formações alongadas que nascem em fundo cego, junto à parede anterior dos testículos, dentro dos lóbulos testiculares. Internamente aos túbulos encontram-se duas populações celulares: as células de Sertoli, derivadas do epitélio celômico e a linhagem germinativa, derivada do endoderma do saco vitelino.

A espermatogênese apresenta uma taxa de maturação que é uma constante espécie-específica, tornando também constante a duração do processo. Ela toda pode ser dividida em quatro componentes sucessivas, cada uma com requerimentos e características próprias. Assim temos: 1) Proliferação e renovação da espermatogônia indiferenciada; 2) Diferenciação da espermatogônia ou espermatocitogênese; 3) Desenvolvimento do espermatócito ou meiose e, 4) Desenvolvimento da espermátide ou espermatogênese (HUCKINS, 1983).

O processo espermatogenético se inicia com a célula germinativa primitiva, a espermatogônia. É relativamente pequena com núcleo irregular e cromatina de acordo com os diferentes tipos. Localiza-se junto à membrana basal do túbulo seminífero, no compartimento basal. Na maturidade sexual toma um de dois caminhos: sofre mitose permanecendo como a célula mãe, tornando um "pool" de reserva celular ou, para de se dividir e cresce dando origem ao espermatócito I, primário ou de primeira ordem.

Os espermatócitos primários são as maiores células da linhagem germinativa. Sofrem divisão reducional e resultam nos espermatócitos II, secundários, ou de segunda ordem. Estas células passam por uma divisão equacional (meiose II) e formam-se as espermatídes.

As espermatídes são células pequenas, localizadas próximo ao lúmen do túbulo seminífero, que sofrem profundas e complexas modificações, num processo chamado espermatogênese, cujo resultado final será o surgimento dos espermatozóides.

A espermatogênese em camundongos e ratos é semelhante à dos mamíferos e portanto permite comparação (FARRIS e GRIFFITH, 1967).

Desde a introdução da saponina da Castanha da Índia, Escina, na terapia, surgiram inúmeros trabalhos a respeito desse anti-exsudativo na farmacologia e toxicologia. Experimentos relacionados à reprodução, à maturidade sexual e sobre a fertilidade, com exceção da pesquisa de KREYBIG e PRECHTEL (1977), não foram realizados até então, segundo os próprios autores e a Revista da Literatura.

Os resultados do presente trabalho ampliam o espectro dos inúmeros levantamentos de dados sobre toxicidade, relação dose-efeito e mecanismo de ação da Escina.

A DL-50 da escina para ratos machos é de 17 mg/kg, intraperitonealmente. Quando aplicada endovenosamente, a DL-50 é, segundo VOGEL E MAREK (1962), ao redor de 16,8 mg/kg. No entanto, outros trabalhos (VOGEL, MAREK e OETNER, 1970) mostram que a quota média de letalidade, fortemente dependente de diversos fatores (linhagem, alimentação, porte) está em torno de 2,0 mg/kg. Em função dessa discrepância há a necessidade de outros experimentos para melhor quantificação da DL-50.

Neste experimento utilizou-se doses de escina, nas concentrações de 1,71 mg/kg e 3,42 mg/kg de peso. Foram administrados 20 injeções, via intraperitoneal, no período de 20 dias.

Nos animais do sub-grupo IIa, que receberam doses de 1,71 mg/kg pode-se notar uma atrofia incipiente dos túbulos seminíferos, com a espermatogênese chegando apenas a cito I. Porém, nos animais que receberam doses de 3,42 mg/kg de escina, sub-grupo IIb, a atrofia foi severa em quase a totalidade dos túbulos bem como do epitélio germinativo. Os espermatozóides não foram encontrados e notam-se somente algumas células de Sertoli.

Do exposto, pode-se deduzir que a escina apresentou, indiretamente, um efeito sobre a diferenciação celular, principalmente sobre as 2 primeiras fases da espermatogênese: a proliferação e renovação da espermatogônia indiferenciada e a diferenciação da espermatogônia.

O hormônio folículo-estimulante (FSH) é o responsável pelo desenvolvimento do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos; entretanto, é necessária a ação sinérgica do LH. A transformação da espermatogônia em espermatozóides maduros somente ocorre na presença da testosterona.

As células intersticiais de Leydig, de origem mesenquimal, são as principais produtoras dos andrógenos. A secreção da testosterona está sob o controle hipofisário do LH. Este hormônio atua nas células de Leydig estimulando o seu desenvolvimento morfológico e funcional. Estimula também a conversão intramitocondrial do colesterol em pregnenolona, passo limitante da síntese hormonal.

Estimuladas pelo LH, as células de Leydig produzem e lançam na circulação sistêmica testosterona, que vai atuar nos tecidos andrógeno-dependentes e, por ação da enzima 5- α -redutase, se transforma em diidrotestosterona (DTH) que é o composto que se liga ao receptor nuclear.

Dessa forma, conforme descrito anteriormente, pode-se sugerir que a escina tenha atuado, afetando de alguma forma o desenvolvimento morfofuncional das células de Leydig, o que prejudicou a produção da testosterona e como consequência, seus efeitos sobre a espermatogênese.

Isto pode ser subsidiado pelo fato que os animais do Grupo III, sub-grupos IIIa e IIIb, que receberam doses de escina semelhantes às do Grupo II, sub-grupos IIa e IIb, acrescidas pela administração da testosterona (2,0 e 4,0 mg/kg, respectivamente) mostraram aspectos histológicos semelhantes aos dos animais do Grupo I (Controle). Ou seja, a testosterona impediu a instalação da atrofia e a degeneração

celular nos túbulos seminíferos, assim como atuou no desenvolvimento da espermatogênese.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, diferem dos apresentados por KREYBIG E PRECHTEL (1977), onde os autores demonstraram em ratos, após a aplicação de doses intraperitoneais de escina (2 x 5,0 mg/kg e 1 x 10,0 mg/kg), não haver nenhuma alteração no desenvolvimento das gônadas bem como interferência na espermatogênese. Entretanto, quando administraram doses em concentrações mais elevadas (15 a 20 mg/kg) observaram indícios de reação tóxica 3 a 5 minutos após a aplicação, culminando com a morte dos animais 7 a 96 horas após o tratamento.

Neste trabalho, foram aplicados 20 doses seguidas de 1,71 mg e 3,42 mg/kg de peso, respectivamente, aos animais dos 2 Grupos Experimentais (II e III). Estas doses, provavelmente, tenham tido algum efeito cumulativo, induzindo à toxicidade tecidual culminando com a atrofia e degeneração do epitélio tubular.

A despeito de todas essas observações existe a necessidade de se propor estudos mais aprofundados a respeito dos efeitos da escina sobre a reprodução, a maturidade sexual e a fertilidade.

Como sugestão, recordando que a testosterona previniu a instalação da atrofia e degeneração celular nos túbulos seminíferos dos animais do Grupo III, fato observado nos resultados deste trabalho, uma vez que a degeneração do epitélio germinativo, principalmente verificado no sub-grupo IIb, mostra destruição das gônias e, sem elas não é possível regeneração, poder-se-ia pesquisar, através de biópsias em animais vivos, a evolução do epitélio germinativo antes, durante e após o tratamento com a Escina de

Reparil.

Existe também a necessidade de se verificar com maior precisão, a DL-50 da Escina uma vez que mesmas doses, utilizadas por vários pesquisadores, tem mostrado resultados discordantes principalmente, em relação à toxicidade e hemólise.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A análise e discussão dos resultados obtidos neste trabalho subsidiam as seguintes conclusões:

1) A escina em dose terapêutica (1,71 mg/kg), provocou atrofia incipiente dos túbulos seminíferos e parada na diferenciação celular com a espermatogênese chegando apenas a espermátócito primário.

2) A escina em doses duas vezes maior que a terapêutica (3,42 mg/kg), provocou atrofia tubular severa e desaparecimento das células germinativas.

3) A administração da testosterona impediu a instalação da atrofia e a degeneração celular dos túbulos seminíferos e promoveu o desenvolvimento da espermatogênese.

CAPÍTULO VII

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AICHNGER, F.; GISS, G.; VOGEL, G. Neue befunde zur Pharmakodynamik von Bioflavonoiden und des Rofkastanien - saponins Aescin als Grundlage ihrer Anwendung in der therapie. *Arzneim., -Ersch.* (Drug Res.), 14: 892-896, 1964.
02. ARAUS, J.F. Estudo dos Antiinflamatórios de Origem Vegetal (Bromelina, Escina e Papaina) em Cirurgia. Piracicaba, 1982. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
03. BUSATO, M.S.S. Efeito de Antiinflamatórios Enzimáticos (Bromelina, Escina e Papaina) no Desenvolvimento Crânio-Facial de Ratos. Piracicaba, 1985. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
04. EVERSMANN, R. The drug treatment of oedema after maxillo facial operations. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 24: 238-241, 1960.
05. FARRIS, E.J. & GRIFFITH, J.Q. The rat in laboratory investigation. 2ª edição - New York, Hafner Publ., 1967.

06. GIRERD, R.J.; DI PASQUALE, G.; STEINETZ, B.G.; BEACH, V.L.; PEARL, W. The anti-edema properties of aescin. *Arch. Int. Pharmacodyn*, 1: 127-136, 1961.
07. GOLDENBERG, N. & PRESTES, N.M. Tratamento preventivo dos edemas em cirurgia buco-maxilo-facial com o emprego da escina (Estudo Experimental). Resumos do Vº Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, S.Paulo, 1979.
08. HEFTI, F. & KAPPELER, U. Klinische untersuchung von aescin. Ampullen bei postoperative und posttraumatischen oedemen. *Schweiz. Rundschau med.*, 64: 72-76, 1975.
09. HUCKINS, C. Adult spermatogenesis: characteristics, kinetics and control in infertility on the male. LIPSHULTZ, L.I. and HOWARDS, S.S. - Churchill Livingstone Inc. 1983, pg. 99-118.
- 10- KREYBIG, TH & PRECHTEL, K. Toxizitäts-und Fertilitätsstudien mit Aescin beider Ratte. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)*, 22(II): 1465-1466, 1977.
11. LANG, W. & MENNICKE, W.H. Pharmacokinetic Study on Tritiated Escin in mouse and Rat. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)*, 22: 1928-1932, 1972.
12. LOCKS, H. The influence of horse chestnut extracts on venous tone. *Arzneim. Forsch.*, 24: 1347-1350, 1972.

13. MAGLIULO, E.; CARCO, F.P.; GORINI, S.; BARIGAEZZI, G.M. In vivo and in vitro researchs the antiphlogistic action of the escine. *Arch. Sc. Med.*, 125: 207-218, 1968.
14. MINGRINO, S. & SCANARINI, M. Effect antiedema dell'escina a livello cerebrale. *Minerva Anestesiologica*, 44(6): 355-360, 1978.
15. ROTHKOPF-ISCHEBECK, M. & VOGEL, G. The effect of Prostaglandin E1 (PGE1) on the plasma-lymph barrier of the hind limb of rabbits and its antagonization by Aescin and indomethacin. *Lymphology*, 13: 47-52.
16. SIERING, H. Die Permeabilitat von zellmembranen fur Ionen unter dem einfluf von Aescin. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)*, 12: 376-378, 1962.
17. SILVA, L.C.; ARBEX, S.M.; NEDER, A.C. Efeito de antiinflamatórios enzimáticos (Bromelina, Escina e Papaina) no desenvolvimento de coluna vertebral de ratas. *E. Med.*, 21(1): 05-08, 1985.
18. TORELLI, L. La prévention de l'oedeme laryngé dans l'intubation oro-trachéale prolongée avec le sal sodique d'escine. *Aggressologie*, 10: 81-83, 1968.

19. UEBEL, H. & PATT, P. Das therapeutisch wirksame Purizip der Rofkastanie (*Aesculus hippocastanum*). *Arzneim., Forsch., (Drug Res.)*, 10: 280-284, 1960.
20. VEVEY, A. *Rev. de Therap. Med. Chirurg.*, 1896; *ibid.* 1900. *Anjoumedical* 1909.
21. VOGEL, G. & MAREK, M.L. Zur Pharmakologie einiger saponine. *Arzneim., Forsch., (Drug Res.)*, 12: 815-818, 1962.
22. _____; _____; OERTNER, R. Studies on the mechanisms of therapeutic and toxic actions of the horse chestnut saponin Escin. *Arzneim., Forsch., (Drug Res.)*, 20: 699-703, 1970.
23. _____; _____; STOECKERT, I. Weitere untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Rofkastanien - Saponins Aescin. *Arzneim., Forsch., (Drug Res.)*, 13: 59-60, 1963.
24. _____ & UEGEL, H. Das therapeutisch wirksame Purizip der Rofkastanie (*Aesculus hippocastanum*), 10: 275-279, 1960.

CAPÍTULO VIII

8. RESUMO

8. RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de se verificar os efeitos do anti-inflamatório enzimático, de origem vegetal, Escina (Reparil), sobre o testículo e epidídimo de camundongos e sua interação com a testosterona.

Foram utilizados para o experimento 50 camundongos machos (*Mus musculus albinus*) com 30 a 45 dias de idade, pesando entre 35 a 45g. Os animais foram distribuídos casualmente, em três grupos experimentais:

GRUPO_I - CONTROLE_(NORMAL) - constituído por 10 animais que receberam diariamente, durante 20 dias, via I.P., solução de NaCl a 0,9%;

GRUPO_II - ESCINA - constituído por 20 animais, redistribuídos em 2 sub-grupos. Sub-grupo IIa, 10 animais que receberam, durante 20 dias, via I.P., uma dose diária de Escina (1,71 mg/kg de peso) e sub-grupo IIb, 10 animais que receberam, pelo mesmo período e pela mesma via, Escina na concentração de 3,42 mg/kg de peso.

GRUPO_III - ESCINA_+_TESTOSTERONA - constituído por 20 animais, redistribuídos em 2 sub-grupos de 10 camundongos cada. Sub-grupo IIIa, animais que receberam, durante 20 dias, via I.P., dose diária de Escina (1,71 mg/kg de peso) e dose diária de testosterona (2,0 mg/kg de peso) e sub-grupo IIIb, animais que receberam, pelo

mesmo período e mesma via, doses de Escina (3,42 mg/kg de peso) e de testosterona (4,0 mg/kg de peso).

Os animais foram sacrificados 5 dias após o período experimental e retirou-se o testículo e o epidídimo para análises histológicas.

Face aos resultados obtidos, verificou-se que a Escina em dose terapêutica provocou atrofia incipiente dos túbulos seminíferos e parada na diferenciação celular. Em dose dupla provocou atrofia tubular severa e desaparecimento das células germinativas. A testosterona administrada impediu a instalação da atrofia e a degeneração dos túbulos seminíferos. Promoveu também, o desenvolvimento da espermatogênese.