

Influência de diferentes extratos de *azadirachta indica* na estrutura dos túbulos seminíferos de ratos wistar

Fernanda Carolina Ribeiro Dias^{1,2}

Olávio Campos Junior^{1,3}

Wolfgang Harand⁴

Elizabeth Neves de Melo¹

1. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
2. Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, MG, Brasil.
3. Faculdade de Medicina de Olinda, Recife – PE, Brasil
4. Instituto do Semiárido, Campina Grande - PB, Brasil.

RESUMO

Introdução: A *Azadirachta indica* é uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional, porém seus efeitos sobre a função reprodutiva masculina permanecem controversos. **Objetivo:** investigar a influência de oito extratos obtidos das folhas e sementes do nim sobre parâmetros biométricos e morfométricos do testículo de ratos Wistar adultos. **Métodos:** 60 animais foram distribuídos em 09 grupos. Os extratos foram administrados por gavagem durante 30 dias. Após eutanásia, os testículos foram coletados, processados e analisados. Os extratos exibiram efeitos distintos, os extratos de sementes e de folhas de *Azadirachta indica* produziram efeitos distintos sobre a morfometria testicular. **Resultados:** alguns extratos de sementes promoveram redução do peso testicular, diminuição do índice gonadosomático e alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos, indicando possível comprometimento estrutural. Extratos de folhas também exerceram impacto na altura do epitélio seminífero e no lúmen tubular, sugerindo modulação da dinâmica celular no interior dos túbulos. Em conjunto, os resultados demonstram que diferentes frações químicas da planta podem influenciar parâmetros estruturais relacionados à espermatogênese. **Conclusão:** Os resultados indicam que componentes específicos dos extratos de *A. indica* podem modular a arquitetura tubular testicular, sugerindo potencial impacto sobre a espermatogênese. Os extratos aquoso da semente e acetato de etila da folha demonstraram maior interferência estrutural, sendo recomendados para análises futuras detalhadas sobre função reprodutiva.

Palavras-chave: fitoterapia; toxicidade; fertilidade masculina; testículo.

Influence of different *azadirachta indica* extracts on the structure of seminiferous tubules in wistar rats

ABSTRACT

Introduction: *Azadirachta indica* is a plant widely used in traditional medicine, but its effects on male reproductive function remain controversial. **Objective:** To investigate the influence of eight extracts obtained from neem leaves and seeds on biometric and morphometric parameters of the testicles of adult Wistar rats. **Methods:** 60 animals were distributed into 9 groups. The extracts were administered by gavage for 30 days. After euthanasia, the testicles were collected, processed, and analyzed. The extracts exhibited distinct effects; the seed and leaf extracts of *Azadirachta indica* produced distinct effects on testicular morphometry. **Results:** In general, some seed extracts promoted a reduction in testicular weight, a decrease in the gonadosomatic index, and alterations in the diameter of the seminiferous tubules, indicating possible structural impairment. Leaf extracts also exerted a significant impact, especially on the height of the seminiferous epithelium and the tubular lumen, suggesting modulation of cellular dynamics within the tubules. Taken together, the results demonstrate that different chemical fractions of the plant can influence structural parameters related to spermatogenesis, albeit with varying intensities and directions depending on the plant part and the extraction solvent used. **Conclusion:** The results indicate that specific components of *A. indica* extracts can modulate testicular tubular architecture, suggesting a potential impact on spermatogenesis. The aqueous seed extract and ethyl acetate leaf extract showed greater structural interference and are recommended for future detailed analyses on reproductive function.

Keywords: phytotherapy; toxicity; male fertility; testicle.

Influencia de diferentes extractos de *azadirachta indica* sobre la estructura de los túbulos seminíferos en ratas wistar

RESUMEN

Introducción: *Azadirachta indica* es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional, pero sus efectos sobre la función reproductiva masculina siguen siendo controvertidos. **Objetivo:** Investigar la influencia de ocho extractos obtenidos de hojas y semillas de neem en los parámetros biométricos y morfométricos de los testículos de ratas Wistar adultas. **Métodos:** Sesenta animales se distribuyeron en nueve grupos. Los extractos se administraron por sonda durante 30 días. Tras la eutanasia, se recolectaron, procesaron y analizaron los testículos. Los extractos mostraron efectos diferenciados; los extractos de semillas y hojas de *Azadirachta indica* produjeron efectos diferenciados sobre la morfometría testicular. **Resultados:** Algunos extractos de semillas promovieron una reducción en el peso testicular, una disminución en el índice gonadosomático y alteraciones en el diámetro de los túbulos seminíferos, lo que indica un posible deterioro estructural. Los extractos de hojas también afectaron la altura del epitelio seminífero y el lumen tubular, lo que sugiere una modulación de la dinámica celular dentro de los túbulos. En conjunto, los resultados demuestran que diferentes fracciones químicas de la planta pueden influir en los parámetros estructurales relacionados con la espermatogénesis. **Conclusión:** Los resultados indican que componentes específicos de los extractos de *A. indica* pueden modular la arquitectura tubular testicular, lo que sugiere un posible impacto en la espermatogénesis. El extracto acuoso de semillas y el extracto de hojas con acetato de etilo mostraron una mayor interferencia estructural y se recomiendan para futuros análisis detallados sobre la función reproductiva.

Palabras clave: fitoterapia; toxicidad; fertilidad masculina; testículo.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, povos primitivos faziam uso do conhecimento das plantas, e através de tentativa e erro, procuravam amenizar os males acometidos (Hill, 1972). A espécie *Azadirachta indica* também conhecida como nim ou margosa, é uma árvore nativa da Índia, característica de clima tropical, que vem sendo utilizada há séculos para os mais variados fins (Mossini, Kemmelmeier, 2005). Trata-se de uma planta internacionalmente reconhecida por suas propriedades medicinais, relevantes tanto para humanos quanto para animais (Neves et al, 2005).

O nim apresenta diversas atividades biológicas, como efeitos antivirais, anti-neuroinflamatórios (Sarkar et al., 2020), antibacterianos (Altayb et al., 2022), antifúngicos (Khan et al., 2021), antitumorais (Kumar et al., 2006), inseticidas (Khadija et al., 2023), antidiabéticos (Mohammed et al., 2023), antimaláricos (Abdulai et al., 2023) e potencial contraceptivo masculino (Khillare & Shrivastav, 2003; Seriana et al., 2021). Entretanto, os efeitos sobre a fertilidade são controversos, variando de estudos que afirmam esterilidade completa e recuperação subsequente (Joshi et al., 2011) a nenhum efeito sobre a fertilidade (Raizada et al., 2001; Patil et al., 2023).

Há divergências na literatura quanto à ação do nim sobre a capacidade reprodutiva do macho, que vai desde a completa extinção e posterior recuperação do processo espermatogênico (JOSHI et al., 1996) até a inexistência de ação sobre esse processo (Raizada et al., 2001). O seu efeito na reprodução tem atraído a atenção de pesquisadores por ser um assunto de interesse da saúde pública nacional e global. Nas duas últimas décadas do século passado a participação dos homens nessa área passou a ser alvo de muitos estudos em todo mundo, favorecendo o desenvolvimento de métodos masculinos de controle da fertilidade que podem trazer benefícios sociais e de saúde pública (Lye et al. 2004), em especial, frente aos efeitos colaterais e da inconveniência associados aos métodos contraceptivos já existentes, os quais limitam sua aceitação e contribuem para o desenvolvimento de métodos masculinos adicionais de controle de fertilidade (Lye et al. 2004).

Diante desse cenário de resultados divergentes e da necessidade de ampliar o conhecimento sobre os efeitos do nim na fisiologia reprodutiva masculina, torna-se essencial investigar de forma sistemática os seus possíveis impactos sobre o funcionamento testicular. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a ação de oito extratos obtidos de folhas e sementes de *Azadirachta indica* sobre parâmetros morfofuncionais do testículo, contribuindo para o esclarecimento de seus efeitos sobre a espermatogênese e, conseqüentemente, sobre a capacidade reprodutiva do macho.

METODOLOGIA

5. Animais

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos jovens (90 dias de idade), provenientes do biotério de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Durante todo o tratamento os animais foram mantidos em gaiolas (n=5/ gaiola) com dieta de manutenção (Labina® - Purina) e água *ad libitum*, sendo submetidos a um ciclo invertido diário de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, à temperatura de 22 ± 2 °C, no biotério do Departamento de Anatomia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFPE. Aprovado pela comissão de ética (CCB – processo nº 23076.007224/2009 -19).

6. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados no Centro de Tecnologias estratégicas do Nordeste (CETENE), o extrato foi obtido através da extração fracionada das folhas e semente do nim. As folhas foram coletadas na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e as sementes cedidas pelo CETENE. O material foi coletado e seco na estufa; as folhas foram secas a 40° C e as sementes a 80°C. Após secagem o material foi triturado.

Os extratos foram preparados utilizando sucessivamente os solventes ciclohexano, acetato de etila, álcool metílico e água, nessa ordem. Cada extração foi realizada com uma proporção material/solvente de 1:3, empregando um volume de 1L de cada solvente e concentração de pureza de PA. Após a adição do solvente, o material permaneceu em contato por 24 horas, a temperatura ambiente. Ao término de cada etapa, o material foi filtrado e o resíduo sólido resultante foi reutilizado na extração subsequente com o solvente seguinte. O extrato líquido obtido foi então submetido ao processo de evaporação no rotaevaporador (Fisotom), no qual o solvente foi completamente removido. O material seco resultante foi posteriormente ressuspensionado no veículo apropriado, de acordo com a concentração final necessária para os experimentos.

Figura 1. Fluxo de Obtenção de Extratos Bioativos da Folha e Semente de *Azadirachta indica* (Neem)



Fonte: Autoria própria, 2025

7. Formações dos grupos

Os 60 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 09 grupos experimentais, alguns grupos contendo seis animais e outros 07 animais.

1. Grupo controle - Recebeu diariamente 0,5 mL de óleo de soja (veículo de diluição).
2. Extrato aquoso de sementes do nim (SAQ): receberam 5 mg/kg de extrato em 0,5 mL de óleo de soja.
3. Extrato alcoólico de sementes do nim (SAL): receberam 5 mg/kg de extrato em 0,5 mL de óleo de soja.
4. Extrato de acetato de etila de sementes do nim (SAC): receberam 5 mg/kg do extrato em 0,5 mL de óleo de soja.
5. Extrato hexânico de sementes do nim (SH): receberam 5 mg/kg de extrato em 0,5 mL de óleo de soja.
6. Extrato aquoso de folhas do nim (FAQ): receberam 5 mg/kg de extrato em 0,5 mL de óleo de soja.
7. Extrato alcoólico de folhas do nim (FAL): receberam 5 mg/kg de extrato em 0,5 mL de óleo de soja.
8. Extrato de acetato de etila de folhas do nim (FAC): receberam 5 mg/kg do extrato em 0,5 mL de óleo de soja.
9. Extrato hexânico de folhas do nim (FH): receberam 5 mg/kg de extrato em 0,5 mL de óleo de soja.

Todos os tratamentos foram administrados por gavagem, diariamente, durante 30 dias consecutivos. A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após a última administração.

8. Eutanásia, coleta, fixação e análise

Os animais foram pesados e a eutanásia ocorreu após administração de tiopental sódico (i.p. 30 mg/kg). Os órgãos foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%) através da aorta ascendente, por 2 minutos. Os testículos foram removidos, dissecados, pesados e fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 4% + paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,01M, pH 7,4) por 24h. Os órgãos foram desidratados em etanol e incluídos em parafina. Cortes semi-seriados (5µm de espessura) foram preparados em micrótomo (RM 2255, Leica), respeitando o intervalo mínimo de 39µm entre os cortes. As lâminas histológicas foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1%. Para análise morfométrica e estereológica, as imagens digitais foram obtidas em fotomicroscópio de campo de luz (Olympus BX -53) equipado com câmera digital (Olympus AX70 TRF). Todas as imagens foram analisadas no programa *Image J*® (National Institute of Health, EUA).

9. Cálculos do Índice gonadossomático (IGS)

Com a obtenção dos pesos corporal e testicular no dia da eutanásia, foi calculado o IGS, o qual corresponde à relação percentual entre a massa testicular e o peso corporal para todos os grupos experimentais (Dias et al., 2019).

10. Análises Morfométricas

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido medindo-se aleatoriamente 20 cortes transversais de túbulos seminíferos, o mais circular possível, sem considerar o estágio de epitélio seminífero. Os mesmos cortes foram utilizados para medir o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero. A mensuração da altura do epitélio foi realizada medindo-se 2 medidas diametralmente opostas, também de 20 túbulos seminíferos e foi obtida a média dos dois valores mensurados.

A proporção volumétrica (%) de túbulos seminíferos foi estimada a partir da contagem de 266 pontos em 10 campos aleatórios das lâminas histológicas, totalizando 2.660 pontos para cada animal. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando a porcentagem ocupada por cada

constituente multiplicada pelo volume do parênquima testicular. Como a densidade do testículo dos mamíferos é em torno de 1, a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume. O comprimento total dos túbulos seminíferos (STL) foi estimado com base em seu volume dentro do parênquima testicular e no diâmetro médio dos túbulos. O comprimento total do túbulo por grama de testículo foi calculado dividindo o STL pelo peso do testículo. As análises morfométricas foram feitas de acordo com Dias et al. (2021; 2023).

11. Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram analisados por meio de ANOVA, seguida pelo teste post hoc de Student-Newman-Keuls. A correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre duas variáveis. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para verificar possíveis agrupamentos, eliminar redundâncias e definir as variáveis mais importantes durante a separação dos grupos experimentais. Para isso, os dados foram transformados (variando) para padronização devido a diferentes magnitudes de escala. O nível de importância de cada variável foi determinado pelos valores do vetor próprio (McGarigal et al., 2000), com valores substanciais de correlação determinados para cada atributo em relação aos principais componentes (PC) 1 e 2. O nível de importância de cada PC foi determinado pelo método Broken-stick, onde valores próprios que excediam os valores esperados foram mantidos para interpretação. As análises foram realizadas no software *Fitopac* 2.1.2.85.

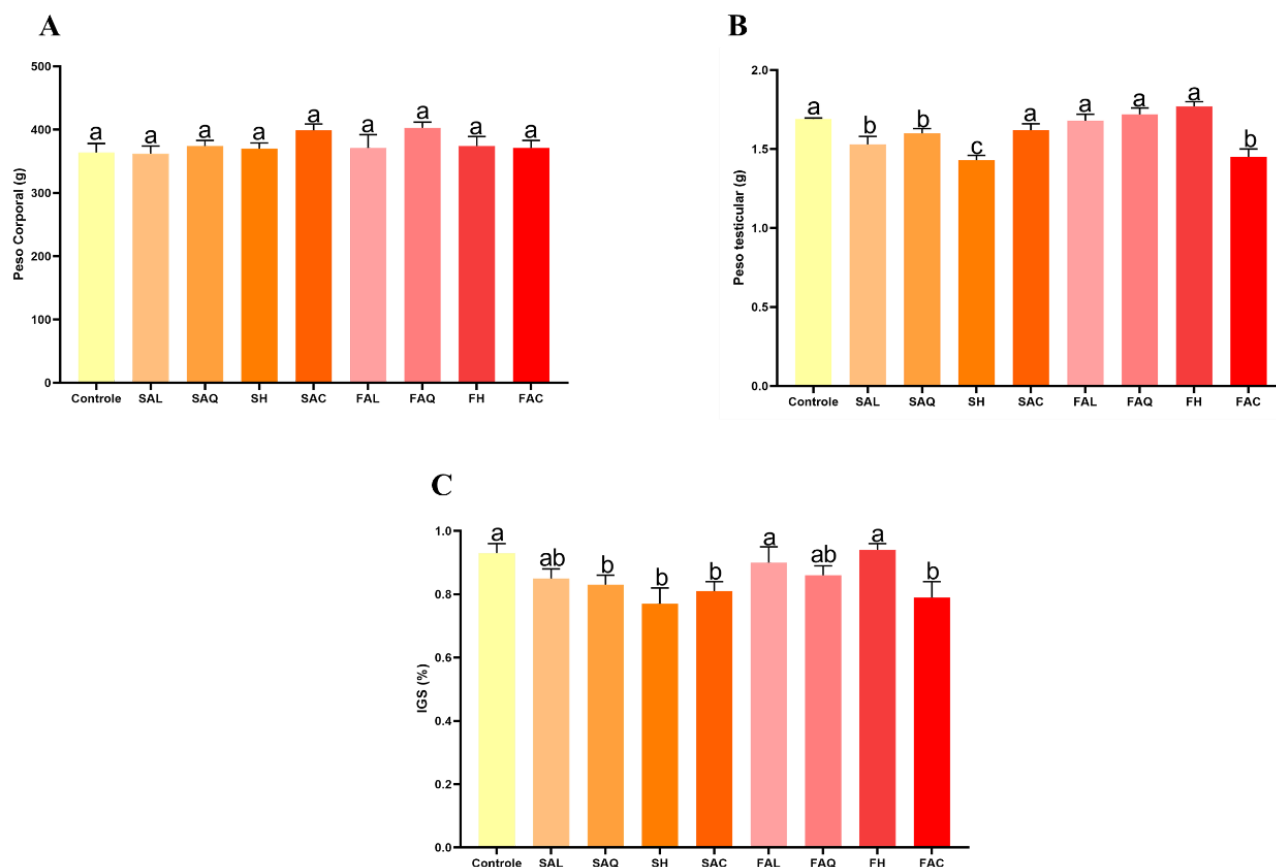
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas alterações no peso corporal entre os grupos experimentais, os pesos observados estavam dentro dos padrões biométricos para essa espécie e a idade que varia entre 450 – 520g (Harkness; Wagner, 1993). Esse resultado corrobora com achados foram observados em outras espécies com outros extratos de plantas como relatado em camundongos tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Dias et al., 2019), infusão aquosa *Heteropterys aphrodisiaca* (Gomes et al., 2011), infusão aquosa *Rudgea viburnoides* (Monteiro et al., 2012), infusão aquosa *Trichilia catigua* A Juss. (Gomes, 2007) e eugenol (Carvalho et al., 2022) (Figura 2).

Entretanto, observou-se redução significativa no peso testicular dos animais dos grupos SAL, SAQ, SH e FAC sendo o que o SH foi ainda menor em relação aos demais grupos. A redução da massa testicular sugere possível comprometimento da espermatogênese, uma vez que o peso do testículo apresenta correlação direta com a produção espermática. Segundo Aman (1970), o peso testicular é proporcional à produção diária de espermatozoides, e, de acordo com Russell et al. (1990) e França e Russell (1998), a massa testicular é um indicador quantitativo confiável da capacidade espermatogênica. Chieriegatto (2005) observou aumento do peso testicular em animais tratados com infusão aquosa *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf e infusão aquosa *Heteropterys aphrodisiaca* em concentrações maiores. O que não corrobora com os nossos achados, uma vez que no presente estudo houve diminuição da massa testicular. Em contraste, a administração de extratos comercial de *Ginkgo biloba* (Oshio et al., 2015), extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Dias et al., 2019), infusão aquosa *Heteropterys aphrodisiaca* (Gomes et al., 2011), infusão aquosa *Rudgea viburnoides* (Monteiro et al., 2012), infusão aquosa *Trichilia catigua* A. Juss. (Gomes, 2007) e eugenol (Carvalho et al., 2022) não provocaram alterações no peso testicular, o que também diverge dos resultados observados no presente estudo. Já animais tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* tetraploide de forma descontínua apresentaram aumento do peso testicular (Dias et al., 2023) (Figura 2). Reforçando que os efeitos sobre a massa testicular podem ser dependentes do tipo de extrato, da concentração aplicada e do regime de administração, o que pode explicar parcialmente as diferenças observadas quando comparadas à literatura disponível.

Como consequência da manutenção do peso corporal e redução do peso testicular, observou-se redução do IGS nos grupos SAC, SAQ, SH e FAC. Contudo, a administração do extrato comercial de *Ginkgo biloba* (Oshio et al., 2015), extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Dias et al., 2019), infusão aquosa *Heteropterys aphrodisiaca* (Gomes et al., 2011), infusão aquosa *Rudgea viburnoides* (Monteiro et al., 2012), eugenol (Carvalho et al., 2022) e infusão aquosa *Trichilia catigua* A. Juss. (Gomes, 2007) não provocaram alterações no IGS o que diverge dos achados do presente estudo, onde foi observada redução deste índice. Por sua vez animais tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* tetraploide de forma descontínua apresentaram aumento do IGS (Dias et al., 2023), o que também não corrobora com os nossos resultados e sugere que os efeitos sobre o IGS podem estar associados ao tipo de extrato, formato de tratamento e concentração administrada. Existe grande variação para o IGS em mamíferos. Kenagy e Trombulack (1986) relatam que o IGS pode variar de 0,01% em baleias a 8,4% em *Tatera afra* um roedor da ordem Cricetidae (Figura 2) reforçando que o IGS é altamente sensível a fatores biológicos e ambientais, o que deve ser considerado na comparação com diferentes estudos.

Figura 2. Parâmetros biométricos de animais tratados com diferentes extratos da semente e folha de *Azadirachata indica* A JUSS.



Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Análise de Variância seguida por teste *post-hoc* Student Newman Keuls).

Fonte: Autoria própria, 2025

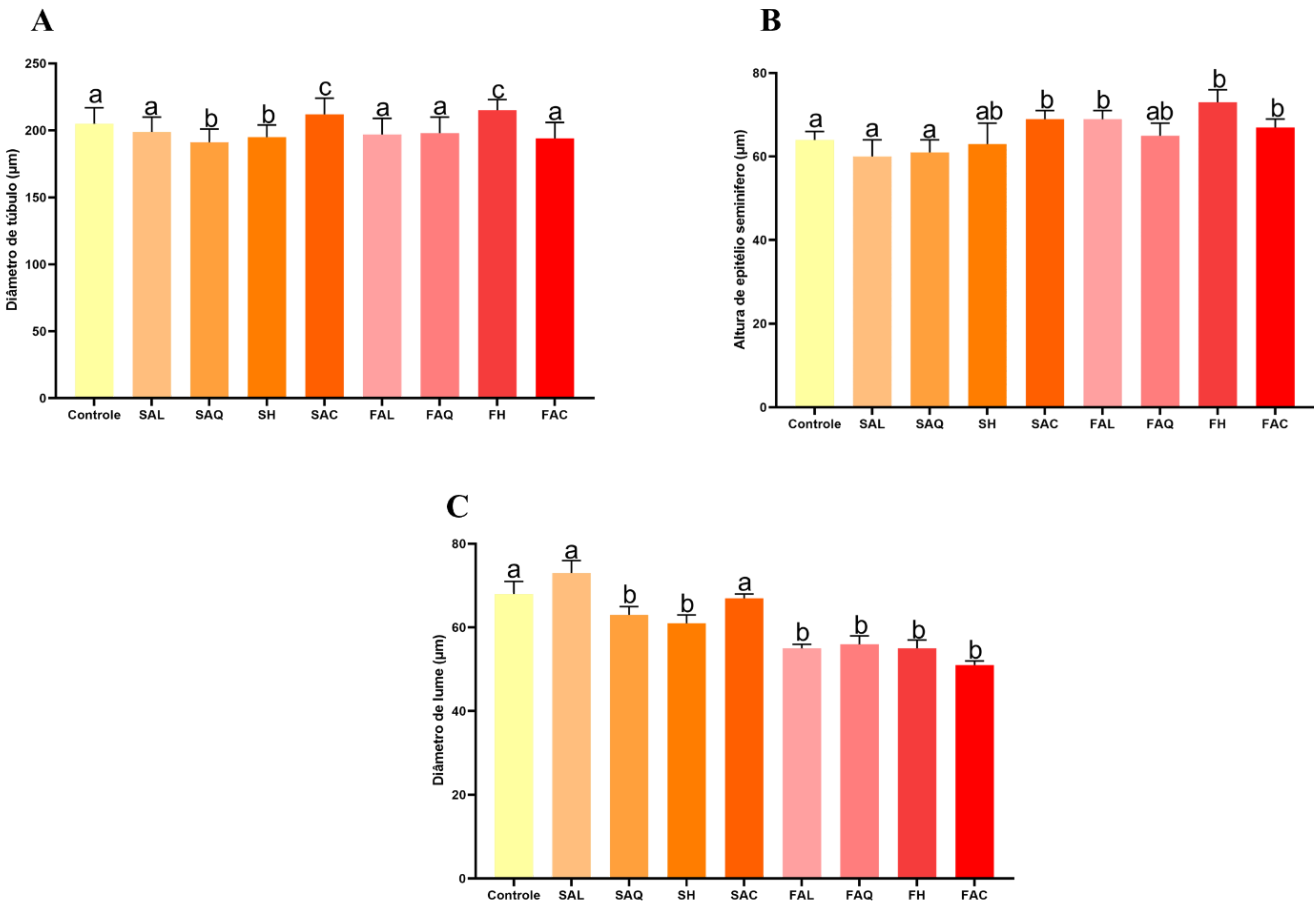
O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero são parâmetros amplamente empregados como indicadores da atividade espermatogênica, uma vez que podem variar em resposta a diferentes estímulos fisiológicos ou tratamentos experimentais (Neves, 2001). No presente estudo, observou-se que o diâmetro dos túbulos seminíferos foi reduzido nos grupos SAQ e SH e aumentado nos grupos SAC e FH. Alterações semelhantes foram relatadas em animais tratados com extratos de Extrato metanólico de *Asplenium dalhousiae* (David et al., 2019), infusão aquosa *Heteropterys aphrodisiaca* (Gomes et al., 2011), Resina de *Rosmarinus officinalis* L. (Nusier et al., 2007) e extrato aquoso de *Dalbergia sissoo* Roxb. (Prakash, 2014). Tais achados corroboram parcialmente com nossos resultados, uma vez que esses estudos também observaram variação significativa no diâmetro tubular associada à interferência na espermatogênese. Por outro lado, animais tratados com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* diploide (Dias et al., 2019), eugenol (Carvalho et al., 2022) e infusão aquosa *Trichilia catigua*

A. Juss. (Gomes, 2007) não apresentaram modificações nesse parâmetro, o que diverge dos achados de nosso estudo para os grupos SAQ e SH. Enquanto o tratamento com o extrato hidroalcoólico da raiz da *Pfaffia glomerata* tetraploide resultou em aumento do diâmetro tubular (Dias et al., 2023) o que está em concordância com o observado nos grupos SAC e FH, onde houve aumento desse parâmetro (Figura 3 e 4).

Em relação à altura do epitélio seminífero, verificou-se incremento nos grupos SAC, FAL, FH e FAC. Achados semelhantes foram descritos em animais tratados com infusão aquosa *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. (Chieregatto, 2005) e com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* tetraploide (Dias et al., 2023), corroborando os nossos resultados e fortalecendo a hipótese de que determinados fitocompostos podem exercer efeito estimulante sobre a espermatogênese. Em contraste, tratamentos com extrato metanólico de *Asplenium dalhousiae* (David et al., 2019), infusão aquosa *Heteropterys aphrodisiaca* (Gomes et al., 2011) e extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* diploide (Dias et al., 2019) reduziram a altura epitelial, o que diverge dos achados do presente estudo e sugere que a resposta epitelial pode ser dependente da espécie vegetal, ploidia, composição química do extrato ou protocolo de administração. Enquanto eugenol (Carvalho et al., 2022) e infusão aquosa *Trichilia catigua* A. Juss. (Gomes, 2007) não promoveram alterações significativas o que não está em concordância com os nossos resultados nos grupos SAC, FAL, FH e FAC, onde houve incremento deste parâmetro (Figura 3).

Por fim, o diâmetro do lúmen foi reduzido nos grupos SAQ, SH, FAL, FAQ, FH e FAC. Redução semelhante foi relatada em animais tratados com extrato metanólico de *Asplenium dalhousiae* (David et al., 2019). No entanto, divergindo dos achados do presente estudo, animais tratados com extrato da raiz de extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* tetraploide apresentaram aumento do diâmetro luminal (Dias et al., 2023), enquanto os tratados com a forma diploide mostraram redução (Dias et al., 2019), apresentando respostas opostas dentro da mesma espécie vegetal, possivelmente relacionadas à ploidia e ao perfil fitoquímico do extrato. Já os tratamentos com eugenol (Carvalho et al., 2022) e infusão aquosa *Trichilia catigua* A. Juss. (Gomes, 2007) não resultaram em alterações nesse parâmetro, o que não está em concordância com a redução luminal observada nos grupos tratados neste estudo (Figura 3).

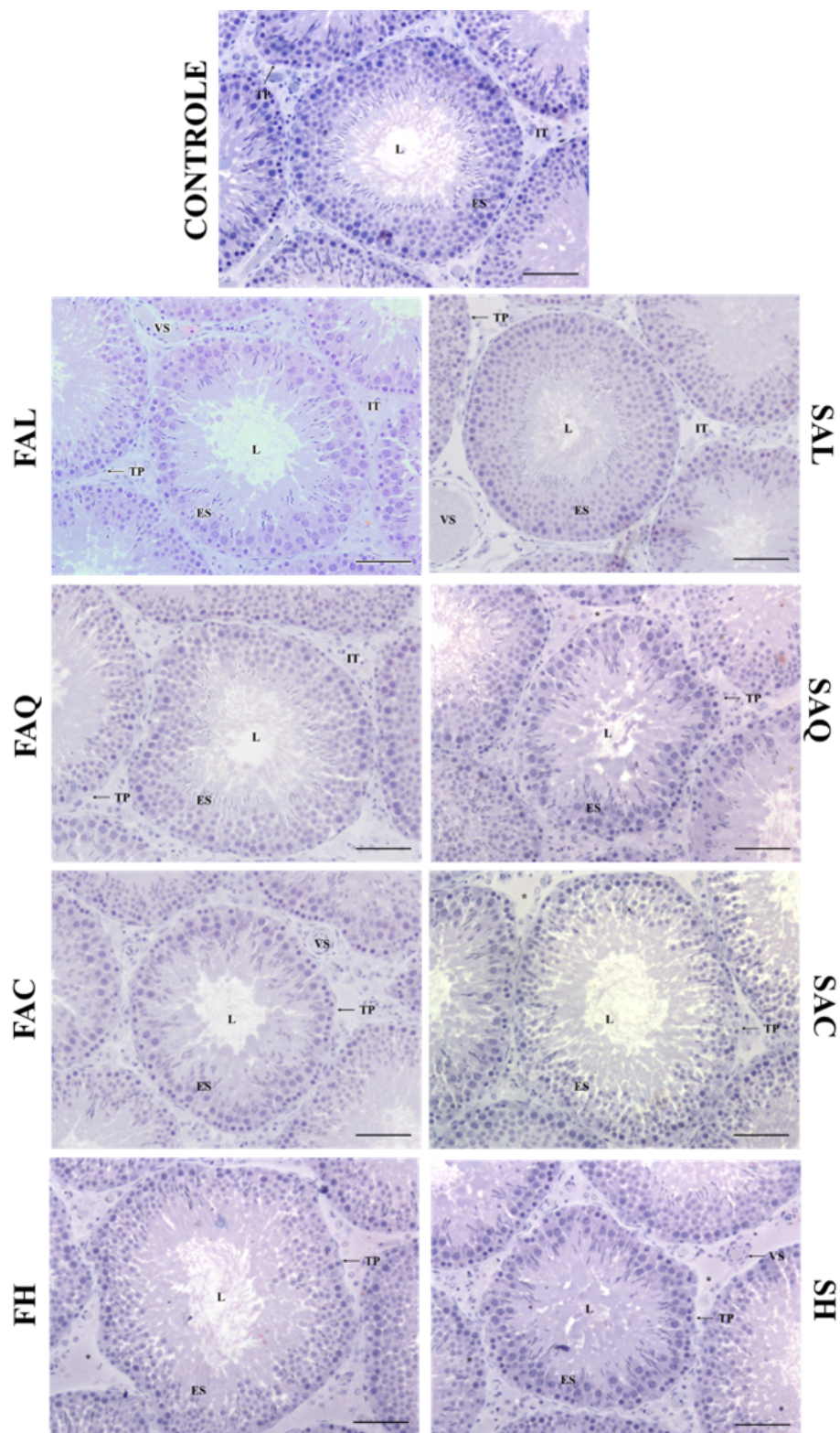
Figura 3. Morfometria de túbulos seminíferos de animais tratados com diferentes extratos da semente e folha de *Azadirachata indica* A JUSS.



Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Análise de Variância seguida por teste *post-hoc* Student Newman Keuls).

Fonte: Autoria própria, 2025

Figura 4: Secção histológica de testículo de animais tratados com diferentes extratos da semente e folha de *Azadirachata indica* A JUSS.

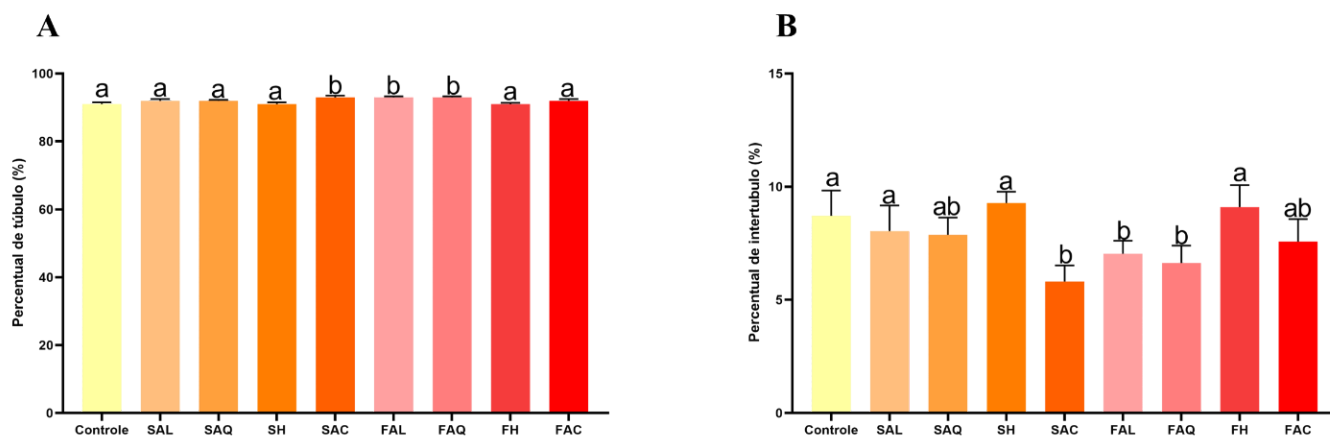


VS- vaso sanguíneo; L- Lúmen; TP – Túnica própria; ES – Epitélio seminífero. EL – Espaço Linfático; IT- Intertúbulo. Barra = 50µm.

Fonte: Autoria própria., 2025

O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos de 70 à 90% da área e o volume de túbulos seminíferos tem relação direta com parâmetros testiculares, como comprimento tubular, produção espermática e população de células de Sertoli (FRANÇA; RUSSELL, 1998). O percentual do túbulo seminífero foi aumentado nos grupos SAC, FAL e FAQ e por consequência o percentual de intertúbulo reduziu nos mesmos grupos. Tal relação inversa entre compartimentos é esperada, uma vez que o testículo mantém proporção estrutural relativamente constante: aumentos no espaço tubular tendem a ocorrer às custas da diminuição do espaço intertubular, e vice-versa (Figura 5). Achados semelhantes foram descritos em animais tratados com extratos de extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*. A forma diploide apresentou redução no percentual de túbulos seminíferos e aumento no percentual de intertúbulo (Dias et al., 2019), padrão também encontrado na forma tetraploide (Dias et al., 2023; Dias et al., 2025), o que diverge dos resultados do presente estudo, nos quais observamos aumento da proporção tubular e redução do intertúbulo. Por outro lado, o tratamento com infusão aquosa *Tynnanthus fasciculatus* promoveu aumento da proporção tubular e redução do intertúbulo (Melo et al., 2010), corroborando diretamente os achados observados nos grupos SAC, FAL e FAQ e reforçando a existência de uma relação compensatória entre os compartimentos estruturais. Em contraste, alguns extratos não produziram alterações detectáveis nesses compartimentos. Animais tratados com infusão aquosa *Heteropterys aphrodisiaca* (Gomes et al., 2011) e com infusão aquosa *Trichilia catigua* A. Juss. (Gomes, 2007) mantiveram percentuais de túbulo seminífero e intertúbulo semelhantes aos controles, o que não está em concordância com as alterações morfológicas observadas no presente estudo e sugere que a resposta estrutural depende da composição fitoquímica e da potenciação biológica de cada extrato.

Figura 5. Proporção dos componentes testiculares de animais tratados com diferentes extratos da semente e folha de *Azadirachata indica* A JUSS.

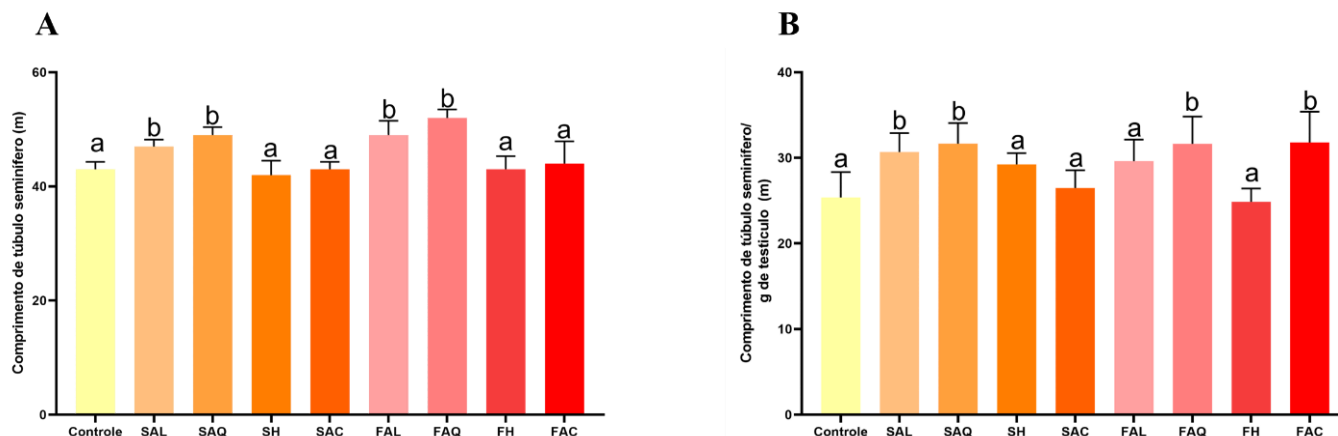


Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Análise de Variância seguida por teste *post-hoc* Student Newman Keuls).

Fonte: Autoria própria, 2025

Segundo França e Russell (1998) a maioria dos mamíferos apresenta de 10 à 15m de túbulo seminífero por grama de testículo. Este parâmetro apresenta correlação direta e significativa com os pesos brutos e líquido testiculares, volume de túbulo seminífero, população de célula de sertoli e produção espermática diária (França; Russell, 1998). Observou-se que o comprimento de túbulos seminíferos por testículo aumentou nos grupos SAL, SAQ, FAL e FAQ, e por grama de testículo aumentou nos grupos SAL, SAQ, FAL e FAC. Esses achados indicam que os tratamentos avaliados favoreceram a ampliação estrutural do compartimento tubular, sugerindo aumento potencial da capacidade espermatogênica. Animais que receberam extrato de infusão aquosa *Heteropterys afrodisiaca* (GOMES et al., 2011) também apresentaram aumento no comprimento dos túbulos seminíferos, corroborando os resultados observados nos grupos tratados do presente estudo. Aqueles que receberam extrato da raiz de extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Dias et al., 2019) apresentaram redução no comprimento por grama de testículo, o que diverge dos resultados observados nos grupos SAL, SAQ, FAL e FAC. Além disso, animais tratados com infusão aquosa de *Trichilia catigua* A. Juss. (Gomes, 2007) não apresentaram alterações significativas nesse parâmetro, não corroborando com o aumento estrutural observado no presente estudo. Esses dados ressaltam que as respostas morfofuncionais do parênquima testicular variam de acordo com o composto utilizado, indicando que diferentes perfis fitoquímicos podem modular de forma distinta o microambiente tubular (Figura 6).

Figura 6. Comprimento de túbulos seminíferos de animais tratados com diferentes extratos da semente e folha de *Azadirachta indica* A JUSS.



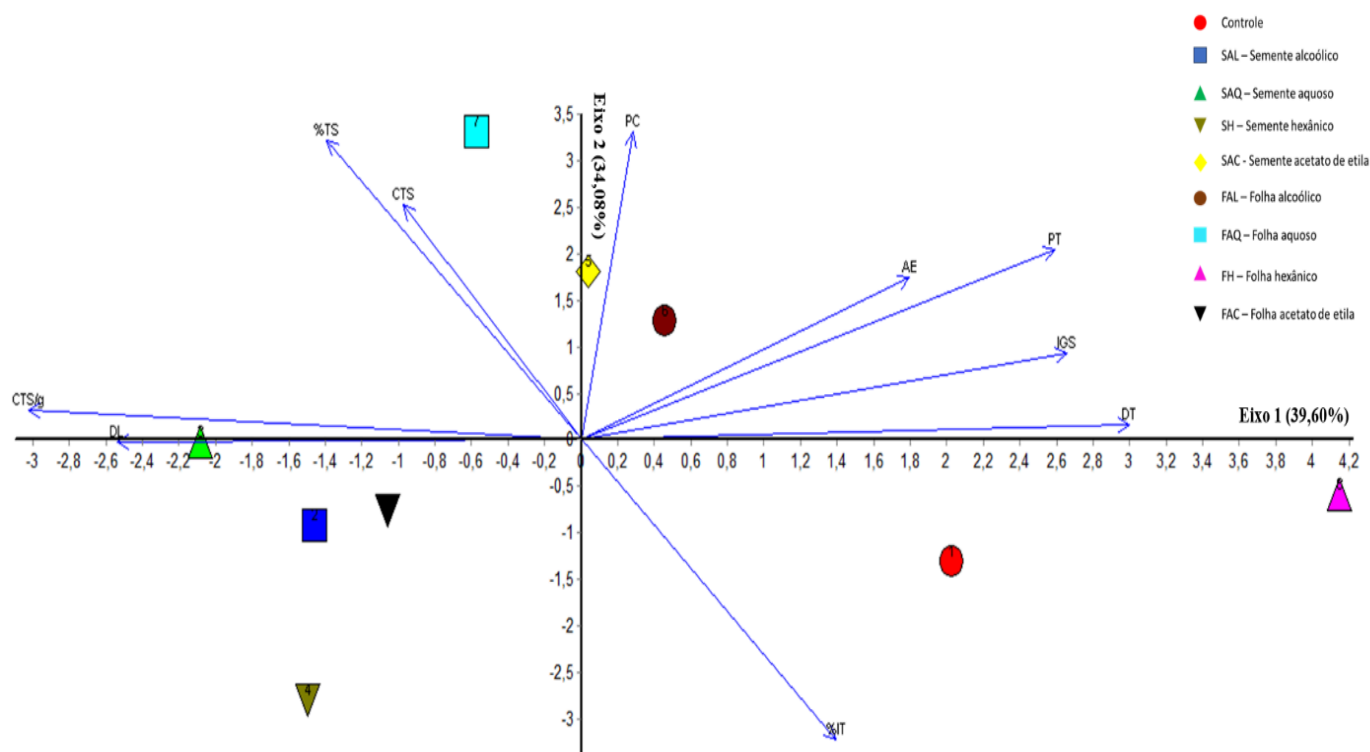
Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Análise de Variância seguida por teste *post-hoc* Student Newman Keuls).

Fonte: Autoria própria, 2025

A variação total dos dados foi de 73,68% sendo que os atributos mais importantes na distinção do grupo apresentaram valores de correlação $> 0,6$ (Figura 7). Para PC1 (eixo horizontal) os atributos mais relevantes e seus respectivos valores de correlação foram Diâmetro tubular (-0,4648), Comprimento de túbulo seminífero por testículo (0,5214) e por grama de testículo (0,5065).

No PC2 (eixo vertical), os tratamentos foram separados principalmente por diâmetro de túbulo seminífero (0,4119), Peso testicular (0,4851), Índice gonadossomático (0,3015), Percentual de túbulo seminífero (0,3684), Percentual de intertúbulo (-0,3684), Comprimento de túbulo seminífero por testículo (0,0538) e por grama de testículo (-0,3448). Ficando evidente a distribuição distinta dos 3 grupos, o primeiro composto pelos grupos controle e o FH estão mais próximos, o segundo composto pelos grupos SAC, FAQ e FAL e por fim o terceiro grupamento composto pelos grupos FAC, SAQ, SH e SAL.

Figura 7. Análise de componente principal de animais tratados com diferentes extratos da semente e folha de *Azadirachata indica* A JUSS.



Fonte: Autoria própria, 2025

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os extratos de *Azadirachta indica* modulam de forma distinta a organização testicular, afetando principalmente parâmetros diretamente associados à espermatogênese, como peso testicular e índice gonadossomático, diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, diâmetro do lúmen, percentual de túbulo e intertúbulo, bem como o comprimento total de túbulos seminíferos. As reduções observadas no peso testicular, IGS e diâmetro tubular apontam para possível diminuição na produção e manutenção das células germinativas, enquanto alterações na altura epitelial e no lúmen refletem modificações na dinâmica celular intratubular e na atividade funcional das células de Sertoli. O extrato aquoso de semente (SAQ) e o extrato em acetato de folha (FAC) foram os que promoveram alterações mais expressivas e abrangentes nesses parâmetros, sugerindo maior potencial modulador sobre a arquitetura tubular e, consequentemente, sobre a espermatogênese. Esses achados reforçam que a parte vegetal utilizada e o solvente empregado determinam respostas biológicas distintas e indicam a necessidade de estudos adicionais para caracterização fitoquímica, análise hormonal e avaliação

funcional da fertilidade, a fim de elucidar os mecanismos envolvidos e o impacto real desses extratos sobre a função reprodutiva masculina.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelo suporte técnico e pela preparação dos extratos utilizados neste estudo.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

USO DE TECNOLOGIAS ASSISTIDAS E IA

Declaramos que não foi utilizado nenhum recurso de Inteligência Artificial no processo de elaboração deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

ABDULAI, Suliat I.; ISHOLA, Ahmed A.; BEWAJI, Clement O. Antimalarial activities of a therapeutic combination of *Azadirachta indica*, *Mangifera indica* and *Morinda lucida* leaves: a molecular view of its activity on *Plasmodium falciparum* proteins. **Acta Parasitologica**, v. 68, p. 659–675, 2023.

ALTAYB, Hisham N; YASSIN, Nijood F.; HOSAWI, Salman *et al.* In-vitro and in-silico antibacterial activity of *Azadirachta indica* (Neem) methanolic extract, and identification of Beta-d-Mannofuranoside as a promising antibacterial agent. **BMC Plant Biology**, v. 22, 2022.

AMANN, Rupert P. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. **Fertility and Sterility**, v. 21, p. 662–672, 1970.

CARVALHO, Renner P. R.; ALMEIDA LIMA, Graziela. D.; RIBEIRO, Fernanda. C. D. *et al.* Eugenol reduces serum testosterone levels and sperm viability in adult Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 113, p. 110–119, 2022.

CHIEREGATTO, Luiz Carlos. **Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos.** Viçosa: UFV, 2005. Tese (Medicina Veterinária).

DAVID, Mehwish; AIN, Qurat Ul; AHMAD, Mushtaq *et al.* A biochemical and histological approach to study antifertility effects of methanol leaf extract of *Asplenium dalhousiae* Hook. in adult male rats. **Andrologia**, v. 51, p. 1–9, 2019.

- DIAS, Fernanda CR.; MACHADO, Jullyana C.; MATTA, Sergio LP. Comparison of the spermatogenic process in three different mice strains: Swiss, Balb/C and C57BL/6. **Bioscience Journal**, v. 37, p. e37035, 2021.
- DIAS, Fernanda. CR.; MARTINS, Ana Luiza. P.; MELO, Fabiana CSA. et al. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and microstructural reorganization of mice testes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 179–189, 2019.
- DIAS, Fernanda CR.; MATTA, MATTA, Sergio LP; LIMA, Graziela D. et al. *Pfaffia glomerata* polyploid accession compromises male fertility and fetal development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 314, p. 116680, 2023.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTÍNEZ, F.; REGADERA, J. (Eds.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. España: Churchill Communications Europe España, 1998. p. 197–219.
- GOMES, Marcos LM. Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. – MELIACEAE). Viçosa: UFV, 2007. Tese (Biologia Celular e Estrutural).
- GOMES, Marcos LM; MONTEIRO, Juliana C.; FREITAS, Karine M. et al. Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenetic advantages. **Biological Research**, v. 44, p. 235–241, 2011.
- HARKNESS, John E.; WAGNER, Joseph E. Biologia e manejo. In: _____. **Biologia e clínica de roedores**. São Paulo: Livraria Roca, 1993. p. 9–55.
- HILL, Albert F. **Economy botany**. 2. ed. New Delhi: Harvard University; Tata McGraw-Hill, 1972.
- JOSHI, A.R.; AHAMED, R.N.; PATHAN, K.M.; et al. Effect of *Azadirachta indica* leaves on testis and its recovery in albino rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 34, p. 1091–1094, 1996.
- JOSHI, Suresh C.; SHARMA, Aksha; CHATURVEDI, Mridula. Antifertility potential of some medicinal plants in males: an overview. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 204–217, 2011.
- KENAGY, G.J.; TROMBULAK, Stephen C. Size and function of mammalian testis in relation to body size. **Journal of Mammalogy**, v. 67, n. 1, p. 1–22, 1986.
- KHADIJA, Uma Z.; RAHMA, I.; JEGA, I. Y.; et al. Insecticidal effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf aqueous extract on flea beetle (*Podagricra* spp.) on roselle in Nigeria. **FUDMA Journal of Agriculture and Agricultural Technology**, v. 9, p. 166–171, 2023.
- KHAN, Muhammad R.; CHONHENCHOB, Vanee; HUANG, Chongxing; et al. Antifungal activity of propyl disulfide from neem (*Azadirachta indica*) in vapor and agar diffusion assays against anthracnose pathogens in mango fruit. **Microorganisms**, v. 9, 2021.
- KHILLARE, Bina; SHRIVASTAV, T. G. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. **Contraception**, v. 68, p. 225–229, 2003.
- KUMAR, Subodh G.; NARAYANA, Kilarkaje; BAIRY, Kurady L.; et al. Dacarbazine induces genotoxic and cytotoxic germ cell damage with concomitant decrease in testosterone and increase in lactate dehydrogenase concentration in the testis. **Mutation Research**, v. 607, p. 240–252, 2006.

- LYE, Robert J.; SIPILÄ, Petra; VERNET, Patrick. *et al.* Male contraception – a topic with many facets. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1–2, p. 75–82, 2004.
- MCGARIGAL, Kevin.; CUSHMAN, Sam; STAFFORD, Susan. **Multivariate statistics for wildlife and ecology research**. New York: Springer-Verlag, 2000.
- MELO, Fabiana CSA.; MATTA, Sergio LP.; PAULA, Tarcízio AR. *et al.* The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. **Biological Research**, v. 43, p. 445–450, 2010.
- MOHAMMED, Abubakar.; KUMAR, Raushan; ASHFAQ, Fauzia. *et al.* Young and mature leaves of *Azadirachta indica* (neem) display different antidiabetic and antioxidative effects. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, p. 316–328, 2023.
- MONTEIRO, Juliana C.; MATTA, Sergio LP.; PREDES, Fabrícia S.; *et al.* Testicular morphology of adult Wistar rats treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. leaf infusion. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 101–105, 2012.
- MOSSINI, Simone AG.; KEMMELMEIER, Carlos A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss.): múltiplos usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139–148, 2005.
- NEVES, Belmior P.; OLIVEIRA, Itamar P.; MACEDO, Flavia R. *et al.* Utilização medicinal do nim. **Revista Eletrônica da Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 1, p. 107–118, 2005.
- NEVES, Elizabeth S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*)**. Belo Horizonte: UFMG, 2001. Tese (Doutorado em Biologia Celular).
- NUSIER, Mohamad K.; BATAINEH, Hameed N.; BATAINEH, Ziad M.; *et al.* Effect of frankincense (*Boswellia thurifera*) on reproductive system in adult male rat. **Journal of Health Science**, v. 53, p. 365–370, 2007.
- OSHIO, Leonardo T.; RIBEIRO, Claudia C. T.; MARQUES, Renato M. *et al.* Effect of Ginkgo biloba extract on sperm quality, serum testosterone concentration and histometric analysis of testes from adult Wistar rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 122–131, 2015.
- PATIL, Shashank M.; SHIRAHATTI, Prithvi S.; KUMARI, Chandana VB.; *et al.* *Azadirachta indica* A. Juss (neem) as contraceptive: an evidence-based review on its pharmacological efficiency. **Phytomedicine**, v. 88, 2023.
- VERMA, Hari P.; SINGH, Shio K. Effect of aqueous leaf extract of *Dalbergia sissoo* Roxb. on spermatogenesis and fertility in male mice. **The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care**, p. 1–12, 2014.
- RAIZADA, Rajendra B.; SRIVASTAVA, Mithilesh K.; KAUSHAL, R. A.; *et al.* *Azadirachtin*, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 477–483, 2001.
- RUSSELL, Lonnie D.; ETTLIN, Robert A.; SINHA HIKIM, Amiya P.; CLEGG, Eric. Histopathological evaluation of the testis. In: RUSSELL, Lonnie D.; ETTLIN, Robert A.; SINHA HIKIM, Amiya P.; CLEGG, E. (Eds.). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Florida: Cache River Press, 1990. p. 210–266.

SARKAR, Lucky; PUTCHALA, Ravi K.; SAFIRIYU, Abass A.; *et al.* *Azadirachta indica* A. Juss ameliorates mouse hepatitis virus-induced neuroinflammatory demyelination by modulating cell-to-cell fusion in an experimental animal model of multiple sclerosis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 2020.

SERIANA, Irma; AKMAL, Muslim; DARUSMAN, Darusman; *et al.* Phytochemicals characterizations of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves ethanolic extract: an important medicinal plant as male contraceptive candidate. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 14, p. 343–350, 2021.

Autor Correspondente:

Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias

Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, MG, Brasil.

Email: fernandaribeiro.dias@hotmail.com

Submissão em 17 de novembro de 2025.

Aceite em 12 de dezembro de 2025.