



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIEGO AUGUSTO LOPES DA SILVA

EFEITOS DO FITOTERÁPICO *Tribulus terrestris* SOBRE A  
PRÓSTATA DO GERBILO DA MONGÓLIA (*Meriones  
unguiculatus*)

EFFECTS OF THE HERBAL REMEDY *Tribulus terrestris* ON THE  
PROSTATE OF THE MONGOLIAN GERBIL (*Meriones  
unguiculatus*)

CAMPINAS

(2017)

# **DIEGO AUGUSTO LOPES DA SILVA**

**EFEITOS DO FITOTERÁPICO *Tribulus terrestris* SOBRE A PRÓSTATA DO GERBILO DA MONGÓLIA (*Meriones unguiculatus*)**

**EFFECTS OF THE HERBAL REMEDY *Tribulus terrestris* ON THE PROSTATE OF THE MONGOLIAN GERBIL (*Meriones unguiculatus*)**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na Área de Biologia Celular.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in the area of Cellular Biology.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO DIEGO AUGUSTO LOPES DA SILVA E ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA.

*Orientador: SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA*

*Coorientador: FERNANDA CRISTINA ALCÂNTARA DOS SANTOS*

**CAMPINAS**

**2017**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2014/26660-0; CNPq, 305840/2015-0

**ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8432-3314>

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

Si39e Silva, Diego Augusto Lopes da, 1987-  
Efeitos do fitoterápico *Tribulus terrestris* sobre a próstata do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) / Diego Augusto Lopes da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.  
Coorientador: Fernanda Cristina Alcântara dos Santos.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Tribulus terrestris*. 2. Próstata. 3. Câncer - Quimioprevenção. 4. Gerbilos. 5. Testosterona. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Santos, Fernanda Cristina Alcântara dos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effects of the herbal remedy *Tribulus terrestris* on the prostate of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)

**Palavras-chave em inglês:**

*Tribulus terrestris*

Prostate

Cancer - Chemoprevention

Gerbils

Testosterone

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Sebastião Roberto Taboga [Orientador]

Luciano de Figueiredo Borges

Taize Machado Augusto

Sílvia Borges Pimentel de Oliveira

Flávia Karina Delella

**Data de defesa:** 30-06-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 30 de junho de 2017.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Prof. Dr. Luciano de Figueiredo Borges

Profa. Dra. Taize Machado Augusto

Profa. Dra. Silvia Borges de Pimentel Oliveira

Profa. Dra. Flávia Karina Delella

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

*Aos meus pais, Edison e Denisi, cujo apoio incondicional sustenta o mérito de cada uma das minhas conquistas.*

## AGRADECIMENTOS

Tenho certeza que serei injusto com muitas pessoas, mas não posso deixar de oferecer um agradecimento especial para aqueles que, sem a menor sombra de dúvidas, são tão responsáveis pelo encerramento de mais este ciclo quanto eu.

A Deus, pelo amor paciente e consolador.

Aos meus pais, para quem uma dedicatória, apenas, não basta. Meu maior motivo de orgulho e de inspiração. E também aos meus familiares que sempre torceram e rezaram por mim.

Ao Dinho, pelo companheirismo, paciência, apoio e cuidado de todas as horas.

Aos amigos que fizeram dos intervalos do trabalho e do laboratório, momentos agradáveis e inspiradores, permaneceram do meu lado quando eu mesmo não ousaria (haja paciência!), e tornaram os fardos mais leves com empatia e palavras de incentivo.

À Gobbinha e ao Cadu, que me acolheram e vestiram roupas de família nas terras Tijucanas.

Às companheiras de trabalho, Bianca, Eloísa e Silvana. Sem a valiosa contribuição dessas três, nada disso seria possível.

Ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior, com quem aprendi muito.

À minha Coorientadora, Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, por toda ajuda e dedicação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, do Instituto de Biologia da UNICAMP. Em especial à secretária e mãe Campineira, Líliam Panagio, sempre disponível, competente e sorridente.

À CAPES, ao CNPq, e à FAPESP pelo suporte financeiro concedido para a realização das minhas atividades.

Aos professores que se puseram prontamente à disposição para compor a banca avaliadora deste trabalho e contribuir para o enriquecimento do mesmo: Luciano de Figueiredo Borges, Taize Machado Augusto, Silvia Borges Pimentel de Oliveira, Flávia Karina Delella, Alexandre Bruni Cardoso, Edson Rosa Pimentel e Raquel Fantin Domeniconi.

E, enfim, ao grande responsável pela possibilidade deste trabalho, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pelo ensinamento, pela oportunidade e confiança depositadas em mim. Muito Obrigado Professor! Muito do que sou como profissional, devo ao seu trabalho e exemplo.

PS – Àqueles cujos nomes não aparecem aqui, mas sabem que são especiais demais para serem esquecidos, meu Muito Obrigado!

## RESUMO

A planta *Tribulus terrestris* (TT) é utilizada para o tratamento de inúmeros problemas de saúde em diversas medicinas tradicionais. Uma das principais indicações é no tratamento de disfunções sexuais, supostamente por sua capacidade de interferir no metabolismo androgênico. Por conta disso, o fitoterápico se popularizou entre indivíduos de várias idades, tendo sido utilizado como alternativa natural e legal para anabolizantes. Entretanto, o uso de substâncias que interferem no equilíbrio hormonal pode trazer consequências negativas para a histofisiologia prostática, já que a próstata é um órgão alvo da ação dos andrógenos, sensível às alterações hormonais. Por outro lado, dados da literatura apontam uma possível ação quimioprotetora de alguns dos principais componentes do TT, as saponinas, as quais seriam capazes de atenuar efeitos deletérios da idade e da exposição a agentes tóxicos. Assim, este trabalho se propôs a apresentar uma extensa revisão da literatura a respeito do papel do fitoterápico sobre os aspectos da biologia reprodutiva (Capítulo I) e avaliar os efeitos do uso do extrato de TT sobre os níveis de testosterona e suas consequências sobre a histofisiologia prostática no gerbilo da Mongólia intacto ou exposto ao carcinógeno N-metil-N-nitrosourea (MNU). Para avaliar os efeitos da exposição em curto prazo (Capítulo II), 24 machos foram divididos em quatro grupos: controle experimental, controle da indução carcinogênica (50 mg/kg de MNU em dose única aos 180 dias), controle dos efeitos do TT (11 mg/kg em doses diárias do 180° ao 270° dia) e tratamento pós-indução (11 mg/kg em doses diárias do extrato de TT do 180° ao 270° dia, após dose única de 50 mg/kg de MNU aos 180 dias). Para avaliar os efeitos da exposição em longo prazo (Capítulo III), 24 machos foram divididos em quatro grupos: controle experimental, controle da indução carcinogênica (50 mg/kg de MNU em dose única aos 180 dias), controle do uso prolongado do TT (11 mg/kg em doses diárias do 90° ao 270° dia) e tratamento prolongado associado à indução (11 mg/kg em doses diárias do extrato de TT do 90° ao 270° dia, com dose única de 50 mg/kg de MNU aos 180 dias). O TT não foi capaz de elevar os níveis séricos de testosterona e não causou alterações biométricas em órgãos sensíveis a andrógenos, o que indica baixo potencial anabolizante na dose e nos períodos administrados. Além disso, o fitoterápico pode ter contribuído para a quimioproteção da próstata uma vez que retardou o surgimento de lesões malignas na glândula. Houve uma ação específica do TT em reduzir a atividade da via androgênica canônica (diminuição de receptores de andrógenos e de proliferação de células epiteliais), reproduzindo, *in vivo*, a proteção contra a atividade tumoral já observada *in vitro*. No entanto, apesar de frear o surgimento de lesões malignas, o TT não foi capaz de evitar o surgimento de lesões pré-malignas, especialmente quando a utilização teve início em indivíduos ainda jovens. Dessa forma, os efeitos do TT para a próstata precisam ser melhor compreendidos e o uso do fitoterápico ainda requer cautela.

## ABSTRACT

The plant *Tribulus terrestris* (TT) is used to treat numerous health problems in many traditional medicines. One of the most frequent indication of use is for the treatment of sexual dysfunction, because of its supposed ability to interfere with androgenic metabolism. Because of this, TT became popular among individuals of various ages, having been used as a natural and legal alternative for anabolics. However, the use of substances that interfere with hormonal balance can have negative consequences for prostate histophysiology, since the prostate is an organ that is the target of androgen action and sensitive to hormonal changes. On the other hand, data from the literature indicate a possible chemoprotective action of some of the major components of TT, the saponins, which would be able to attenuate deleterious effects of age and exposure to toxic agents. Thus, this work has proposed to present an extensive review of the literature on the role of this herbal medicine in aspects of reproductive biology (Chapter I) and to evaluate the effects of the use of TT extract on testosterone levels and its consequences on the histophysiology of the prostate in intact Mongolian gerbil, or those exposed to the carcinogen N-methyl-N-nitrosourea (MNU). To evaluate the effects of short-term exposure (Chapter II), 24 males were divided into four groups: experimental control, control of carcinogenic induction (50 mg/kg of MNU in a single dose on the 180° day), control of TT effects (11 mg/kg, in daily doses from 180° to 270° day) and treatment after induction (11 mg/kg of TT, in daily doses from 180° to 270° day, after a single dose of 50 mg/kg of MNU on the 180° day). To evaluate the effects of long-term exposure (Chapter III), 24 males were divided into four groups: experimental control, carcinogenic induction control (50 mg/kg MNU, in a single dose on the 180° day), control of prolonged use of TT (11 mg/kg in daily doses from 90° to 270° day) and prolonged treatment associated with induction (11 mg/kg of TT, in daily doses from 90° to 270° day, with a single dose of 50 mg/kg of MNU on the 180° day). TT was not able to raise serum testosterone levels and did not cause biometric changes in androgen-sensitive organs, which indicates low anabolic potential at the dose and periods administered. In addition, the herbal medicine may have contributed to the chemoprotection of the prostate as it has delayed the onset of malignant lesions in the gland. There was a specific action of TT in reducing the activity of the canonical androgenic pathway (decrease of androgen receptors and proliferation of epithelial cells), reproducing, *in vivo*, the protection against the tumor activity already observed *in vitro*. However, in spite of repressing the onset of malignant lesions, TT was not able to prevent the onset of premalignant lesions, especially when the use started in young individuals. Thus, the effects of TT on the prostate need to be better understood and its phytotherapeutic use still requires caution.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 PRÓSTATA HUMANA .....	11
1.2 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO CLÍNICO DA PRÓSTATA .....	16
1.3 N-METIL-N-NITROSOUREIA (MNU) .....	20
1.4 MODELO EXPERIMENTAL: <i>MERIONES UNGUICULATUS</i> .....	22
1.5 INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O FITOTERÁPICO <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i> .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA</b> .....	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4 CAPÍTULO I</b> .....	<b>33</b>
A REVIEW ON THE ROLE OF <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i> IN THE REPRODUCTIVE BIOLOGY .....	33
<b>5 CAPÍTULO II</b> .....	<b>79</b>
CONSUMO DO FITOTERÁPICO <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i> NÃO APRESENTA EFEITO ANDROGÊNICO E DESEMPENHA PAPEL QUIMIOPROTETOR CONTRA O MODELO DE INDUÇÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA PELA N-METIL-N-NITROSOUREIA NO GERBILO DA MONGÓLIA .....	79
<b>6 CAPÍTULO III</b> .....	<b>110</b>
EFEITOS DO USO PROLONGADO DO FITOTERÁPICO <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i> NOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA E NA QUIMIOPROTEÇÃO DO LOBO VENTRAL DA PRÓSTATA DO GERBILO DA MONGÓLIA EXPOSTOS AO CARCINÓGENO N-METIL-N-NITROSOUREIA .....	110
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>142</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>146</b>
<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>148</b>
<b>10 APÊNDICES</b> .....	<b>161</b>
10.1 DIAGRAMAS DOS DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS .....	161
10.1.1 Delineamento experimental apresentado no Capítulo II .....	161
10.1.2 Delineamento experimental apresentado no Capítulo III .....	161
<b>11 ANEXOS</b> .....	<b>162</b>
11.1 LAUDO DE CONTROLE DE QUALIDADE DO <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i> UTILIZADO .....	162
11.2 CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	163
11.3 DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS .....	164

## 1 INTRODUÇÃO

---

### 1.1 PRÓSTATA HUMANA

A próstata é um órgão de grande importância para a biologia reprodutiva dos mamíferos, desempenhando papel crucial no sucesso da fecundação (LIEM et al., 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011). A secreção da próstata possui diversos componentes com funções específicas e é lançada diretamente na porção prostática da uretra, onde se junta com a secreção das vesículas seminais para dar volume ao líquido seminal, conferindo ao sêmen o seu odor característico (DÂNGELO & FATTINI, 2003).

Dentre os componentes da secreção prostática, destacam-se o antígeno prostático específico (PSA) e a fibrinolisinase, que têm como função manter o sêmen liquefeito, o ácido cítrico, importante para o tamponamento do esperma e proteção dos espermatozoides no ambiente hostil representado pela acidez do fluido vaginal, e os açúcares, em especial a frutose, responsáveis por nutrir e fornecer energia para a locomoção dos gametas masculinos (DÂNGELO & FATTINI, 2003; ROSS & PAWLINA, 2008). Apesar de não ter uma função bem esclarecida, a próstata também secreta a fosfatase ácida prostática (PAP) que, juntamente com o PSA, tem sido utilizado como marcador bioquímico para o câncer de próstata, já que níveis elevados desses dois componentes são comuns em indivíduos com a doença (SIMPKIN et al, 2016; KIRSCHENBAUM et al., 2016). Em homens mais velhos, é possível visualizar a formação de concreções prostáticas conhecidas como corpos amiláceos, derivados da precipitação de secreção ao redor de fragmentos celulares que podem ser calcificados. Todos os produtos da secreção prostática ficam armazenados no lúmen dos alvéolos glandulares e são expelidos pela contração do músculo liso durante a ejaculação (DÂNGELO & FATTINI, 2003; ROSS & PAWLINA, 2008).

Anatomicamente, podemos definir a próstata como um órgão pélvico, ímpar, do tamanho de uma noz e com formato de maçã, localizado na base da bexiga e atravessado pela uretra em toda a sua extensão (LIEM et al., 2001; DÂNGELO & FATTINI, 2003). O órgão está presente em praticamente todos os mamíferos e, além de ser considerada a maior glândula sexual acessória masculina (Figura 1.1 A), também está presente em fêmeas de algumas espécies, inclusive a humana (figura 1.1 B), mesmo que com menor tamanho e atividade (ZAVIAČIČ, 1999; SANTOS et al., 2006).

A próstata começa a se formar durante o período embrionário a partir de múltiplas evaginações do epitélio da uretra prostática que se projetam para o mesênquima circundante. A porção epitelial da uretra prostática dá origem ao epitélio das glândulas prostáticas, e a porção mesenquimal dá origem ao estroma fibromuscular (MOORE et al., 2012). Nas mulheres, no entanto, o crescimento da glândula é afetado pela carência de andrógenos, ela se desenvolve pouco e permanece como brotos epiteliais ramificados circundados por estroma fibromuscular (THOMSON, 2001). No homem adulto, a próstata é rica em tecido muscular e fibroso que circunda um conjunto de 30 a 50 glândulas túbulo-alveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011).

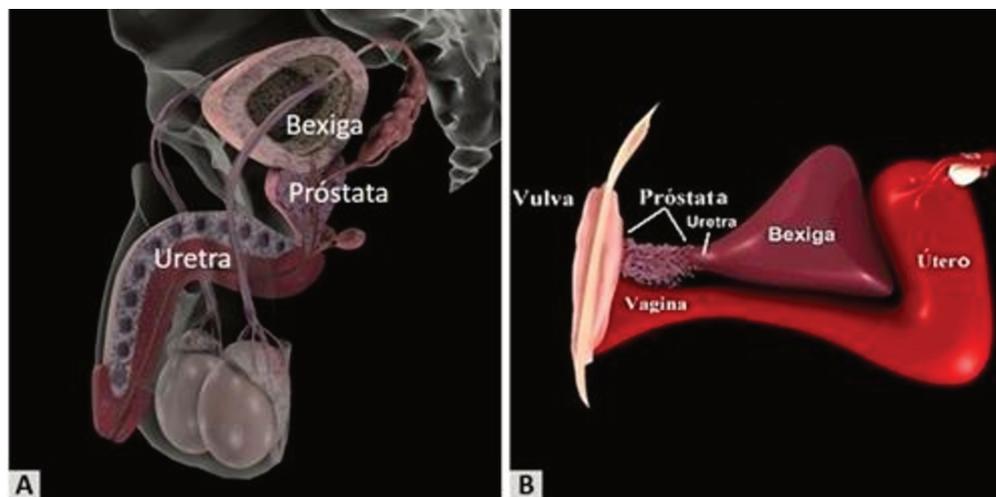


Figura 1.1 Localização anatômica da próstata em homens e mulheres. (A) Esquema do sistema reprodutor masculino. (B) Esquema do sistema reprodutor feminino (fontes: imagens adaptadas da Internet<sup>1</sup>).

O epitélio das glândulas varia entre simples (cuboide ou colunar) e pseudoestratificado (ROSS & PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011). Na próstata normal, o epitélio é composto por diversos tipos celulares que se diferenciam pela morfologia, localização, fisiologia e expressão gênica, mas que exibem uma inter-relação dinâmica (MARZO et al., 1998; KURITA et al., 2004). São elas: as células tronco, células basais, células de amplificação transitória ou “*transitory-amplifying cells*” (TAC), células intermediárias, células neuroendócrinas e células luminiais secretoras (ISAACS & COFFEY, 1989). Toda essa estrutura é envolvida por uma cápsula fibroelástica rica em células musculares lisas que invadem o órgão dividindo-o em lobos. No entanto, com a maturação do órgão, os

<sup>1</sup> Disponível em: (A) <<http://anatomiafacil.com.br/videos/>>; (B) <<http://pensoinsisto.blogspot.com.br/2009/11/prostata-feminina.html>> Acesso em jul. 2016.

lobos tornam-se compactos e são pouco evidentes em adultos, diferente do que se observa em outros mamíferos, como os roedores, que apresentam lobos facilmente distinguíveis (PRICE, 1963; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011).

Por esta razão, em substituição à classificação por lobos, o órgão masculino humano costuma ser dividido em regiões ou zonas, de acordo com as características anatômicas, histológicas e clínicas (figura 1.2). Essa classificação zonal reflete não apenas a diferença estrutural de cada região da próstata, mas também a frequência de doenças que atingem o órgão (MCNEAL, 1981). Segundo McNeal, são diferenciadas três zonas glandulares e uma zona fibromuscular. A zona periférica corresponde a 70% do volume da próstata, guarda a maioria das principais glândulas prostáticas e é a região mais suscetível a inflamações e onde se concentram a maioria dos casos de câncer prostático. A zona central representa 25% do volume prostático, guarda uma pequena parte da porção secretora e é mais resistente a inflamações e carcinomas. A zona de transição contém as glândulas mucosas e consiste no principal sítio de instalação da condição chamada de hiperplasia prostática benigna (HPB), caracterizada pelo aumento da densidade celular em indivíduos mais velhos e que podem levar à compressão da uretra prostática, causando dificuldades de micção. A zona anterior é formada pelo estroma fibromuscular e não apresenta estruturas glandulares (MCNEAL, 1981; SELMAN, 2011; ROSS & PAWLINA, 2008). A zona periuretral (nem sempre considerada como uma zona distinta da zona de transição) contém glândulas mucosas e submucosas e podem contribuir com o agravamento da HPB, devido à sua proximidade com a uretra prostática (ROSS & PAWLINA, 2008).

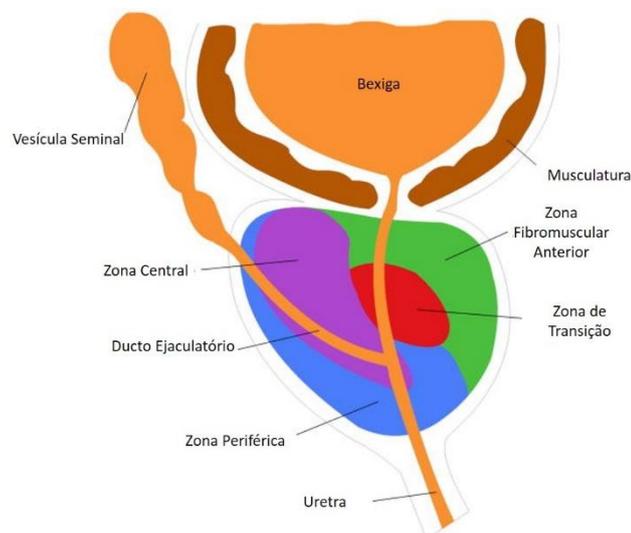


Figura 1.2 Esquema da Anatomia Zonal da Próstata Masculina Humana proposta inicialmente por John E. McNeal (traduzido de FRANZ et al., 2013).

Desde a sua formação no período embrionário, a próstata é dependente de andrógenos. A testosterona é necessária para iniciar o desenvolvimento prostático, para continuar o seu crescimento embrionário e neonatal e, posteriormente, para iniciar a atividade secretória na puberdade (ISAACS et al., 1994). Durante sua formação, as estruturas embrionárias que darão origem à próstata passam por uma importante fase de sinalização e interação epitélio-estromal. Inicialmente, os receptores de andrógenos (AR) são expressos no mesênquima que, sob o estímulo da testosterona, passa a produzir sinalizadores parácrinos que induzem a proliferação do epitélio da uretra, dando origem aos brotos que formarão a próstata. Ao mesmo tempo, o epitélio em transformação produz fatores parácrinos que sinalizam para o estroma, que se diferencia em células musculares lisas e fibroblastos. Com a proliferação dos brotos epiteliais, os AR passam a ser expressos também por essas células, onde será importante para a regulação das proteínas secretórias e diferenciação celular, ao passo que o estroma passa a expressar maior quantidade de receptores de estrógenos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) (HAYWARD et al., 1996; MARKER et al., 2003). Nas fêmeas, a baixa concentração de testosterona no período embrionário permite a formação de uma camada de músculo liso que limita a interação epitélio-mesênquima, impedindo o crescimento da próstata da forma como é observada nos machos, nos quais a formação da camada muscular é tardia ou intermitente (THOMSON, 2001).

Até a adolescência, a próstata se mantém em uma forma rudimentar, iniciando sua maturação com a puberdade, através de vias complexas de sinalização, as quais envolvem andrógenos, receptores de andrógenos, enzimas, fatores de transcrição e de crescimento, entre outros. A partir daí, e durante toda a vida adulta, a morfologia e a fisiologia prostáticas continuam sendo dependentes de andrógenos, que participam de processos de morfogênese, diferenciação celular, proliferação e produção de secreções específicas (CARVALHO-SALLES & TAJARA, 1999).

De forma simplificada, podemos descrever a participação dos andrógenos no controle endócrino da próstata da seguinte forma (figura 1.3): o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é produzido pelo hipotálamo e estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise. Este, por sua vez, induz as células de Leydig testiculares a produzirem testosterona. Além disso, esse hormônio também é produzido pelas suprarrenais que, sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) liberado pela hipófise, são induzidas a secretar androstenediona, que é convertida em testosterona periféricamente. Assim que é liberada no sangue, a testosterona se liga a proteínas, com uma pequena quantidade permanecendo livre (CARVALHO-SALLES & TAJARA, 1999; TABOGA et al., 2009). A testosterona livre e, portanto, ativa, adentra a célula prostática através de difusão simples pela

membrana até chegar ao citoplasma, onde é convertida pela enzima 5-alfarredutase em di-hidrotestosterona (DHT). Esta, por sua vez, se liga aos AR, dissociando-os das proteínas *heat shock* (Hsp) que os mantinham inativos. Os complexos DHT-AR adentram o núcleo, mudam sua conformação e formam dímeros que se ligam às regiões promotoras de genes alvo. A partir do recrutamento de proteínas coativadoras (Co), o complexo adquire a capacidade de modular a expressão de diversos genes, incluindo fatores de transcrição e de crescimento, influenciando, assim, a morfologia, a proliferação e a função da próstata (TINDALL & RITTMASER, 2008).

É importante ressaltar, ainda, que a homeostase prostática envolvendo a proliferação e apoptose depende de uma complexa interação entre os compartimentos epitelial e estromal (TINDALL & RITTMASER, 2008). A resposta aos andrógenos podem ocorrer quando a DHT se liga aos AR de células estromais, as quais produzem fatores parácrinos de crescimento e sobrevivência que difundem para as células epiteliais influenciando seu crescimento e diferenciação (KURITA et al., 2001). Da mesma forma, fatores de crescimento produzidos nas células secretoras luminiais como resposta ao estímulo dos andrógenos podem difundir através da membrana basal e influenciar as atividades do compartimento estromal (JOSEPH et al., 1997).

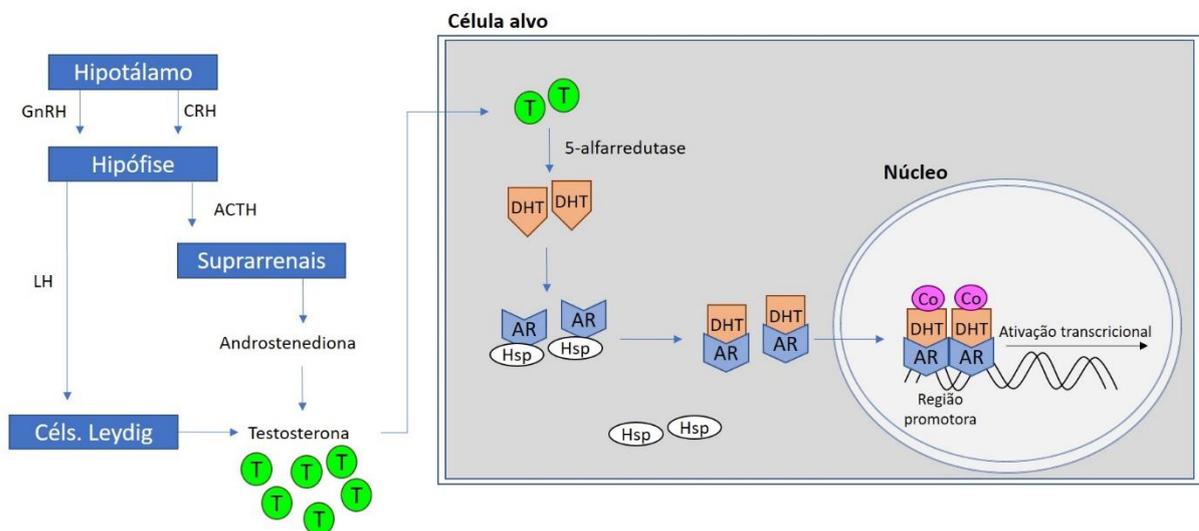


Figura 1.3 Via de sinalização da testosterona (T) envolvendo os receptores de andrógenos (AR) na próstata. Sob estímulo da hipófise, células de Leydig testiculares e as glândulas suprarrenais participam da produção de T que difunde para o citoplasma das células alvo na próstata, onde é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pelas enzimas 5-alfarredutase. A DHT, então, se liga aos AR, causando a sua dissociação das proteínas "heat shock" (Hsp), o que permite a entrada do complexo DHT-AR no núcleo. No núcleo, o complexo sofre dimerização, se liga a regiões promotoras de genes alvo, recruta proteínas coativadores (Co) e, assim, ocorre a ativação transcricional (adaptado de TINDALL & RITTMASER, 2008).

Além dos andrógenos, outros fatores também podem atuar na morfologia e fisiologia da próstata, como os estrógenos, o hormônio do crescimento, a prolactina, a insulina

e fatores produzidos pelas próprias células prostáticas, os quais participam de processos autócrinos, parácrinos ou intrácrinos (CARVALHO-SALLES & TAJARA, 1999). Dessa forma, pode-se afirmar que a próstata é influenciada por fatores extrínsecos (orgânicos, hormonais, alimentares, imunológicos etc.) e intrínsecos (produzidos e utilizados pelo próprio órgão), e não tem sua morfologia e função regulada apenas pelos andrógenos (CUNHA et al., 1987; LEE et al., 1997; CARVALHO-SALLES & TAJARA, 1999).

A atuação dos estrógenos sobre o sistema reprodutor masculino, por exemplo, era desconhecida e foi negligenciada por muito tempo. Hoje sabe-se que esses hormônios são capazes de induzir alterações epiteliais e estromais na próstata, alterando a histoarquitetura e fisiologia do órgão podendo, inclusive, favorecer a instalação de lesões neoplásicas (SCARANO et al., 2005 e 2008; PRINS & KORACH, 2008). Esses dados são importantes quando se considera o fator idade na saúde prostática, tendo em vista a mudança na taxa andrógeno/estrógeno. Essa mudança está relacionada com as alterações histopatológicas observadas na próstata de indivíduos idosos, quando é mais comum se observar a HPB, a fibrose estromal, com aumento da camada fibromuscular e do colágeno subepitelial, e o câncer de próstata (CAMPOS et al., 2006 e 2008; ROSS & PAWLINA, 2008). Pesquisas mostram, ainda, que a exposição prematura a altos níveis de estrógenos ou desreguladores endócrinos com ação semelhante a esses hormônios, inicia modificações estruturais e funcionais na glândula prostática que perduram por toda a vida, aumentando o risco de hiperplasias e displasias na vida adulta e maior risco de desenvolvimento de câncer de próstata com o envelhecimento (PRINS et al., 2006; PRINS, 2008).

## 1.2 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO CLÍNICO DA PRÓSTATA

O câncer de próstata tornou-se uma doença importante da atualidade, especialmente devido ao aumento da expectativa de vida e o envelhecimento das populações, visto que 75% dos casos ocorrem em homens a partir dos 65 anos de idade (POPPEL & TOMBAL, 2011; INCA, 2016). Para as mulheres os dados são escassos, já que a glândula prostática feminina ainda pode ser considerada um órgão vestigial ao qual pouca atenção foi dispensada ao longo dos anos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os tumores prostáticos são a segunda causa de mortalidade de homens em alguns países ocidentais (a primeira é o câncer de pulmão). No Brasil, o câncer de próstata é o segundo tipo mais comum, antecedido apenas pelo câncer de pele do tipo não-melanoma. Em 2013 foram registradas 13772 mortes causadas por esse tipo de câncer, e estima-se 61200 novos casos confirmados da doença em 2016/2017

(INCA, 2016). Esses números refletem o envelhecimento da população brasileira e o aumento no número de diagnósticos, por conta do avanço nos métodos de detecção e pela melhora dos sistemas de informação no país. Por esse motivo, e visto que o câncer de próstata tem etiologia multifatorial (senilidade, hormonal, genética, hábitos de vida, exposição a desreguladores endócrinos etc.), a compreensão do controle do funcionamento e da diferenciação das células prostáticas é de grande relevância e tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas em diversas áreas (TABOGA et al., 2009).

Apesar de ser uma doença grave, a maioria dos homens diagnosticados com o câncer de próstata não morrem por conta da doença. Isso acontece porque alguns sinais derivados de alterações na próstata são facilmente percebidos, muitas vezes facilitando o diagnóstico e antecipando o tratamento. Esses sinais incluem a elevação dos níveis de PSA no sangue, dificuldade de micção e o diagnóstico do que se conhece por lesões pré-malignas prostáticas, as quais podem ser úteis como um sinal de alerta para a saúde prostática, incentivando pacientes a buscar acompanhamento médico (INCA, 2016; ONCOGUIA, 2017). Segundo Griffiths e colaboradores (1998), cerca de 50% dos homens com mais de 50 anos de idade apresentam sintomas de HPB. Além disso, cerca de 90% dos homens com mais de 80 anos de idade possuem comprovação histológica dessa condição (BOYLE, 1994). Apesar dos sintomas da HPB variarem em número e gravidade entre os pacientes, a falta de tratamentos adequados pode levar à evolução dessa alteração para formas mais agressivas das doenças prostáticas, inclusive o câncer de próstata (GAYNOR, 2003).

Por suas características de grande variação em sintomas e gravidade, bem como a possibilidade de diagnosticar indicativos da doença antes dela ser clinicamente comprovada e trazer riscos à saúde, o modelo experimental de câncer de próstata é uma boa opção para estudos de quimioprevenção (POPPEL & TOMBAL, 2011). Dados experimentais e epidemiológicos sugerem que hábitos de vida, dentre eles a alimentação, pode influenciar profundamente na pré-disposição das populações a doenças como o câncer de próstata (GAYNOR, 2003; KIM, 2008; POPPEL & TOMBAL, 2011; YAN & SPITZNAGEL, 2009). Como exemplo, sabe-se que a incidência de câncer de próstata é menor entre homens asiáticos do que entre populações ocidentais (IARC, 2005) e que esse número aumenta entre os asiáticos que adquirem hábitos ocidentais (SHIMIZU et al., 1991), fato que sugere que a mudança de hábitos de vida, especialmente alimentares, influencia na pré-disposição ao câncer.

Acima de qualquer especulação, é consenso entre a classe médica e científica que a maioria dos tumores prostáticos são endócrino-responsivos, isto é, dependem da sinalização provida por hormônios para instalação e ou progressão. Muito se sabe sobre a ação dos

andrógenos na promoção do câncer de próstata. Esses hormônios esteroides têm sido apontados como os acionadores dos gatilhos que iniciam a proliferação de células cancerosas da próstata (TAPLIN & HO, 2001). No entanto, atualmente sabe-se que outros hormônios podem atuar no desenvolvimento da doença, promovendo eventos de sinergismo ou antagonismo junto aos sinalizadores envolvidos com a progressão tumoral. Especialmente aqueles hormônios ligados aos ARs que, como dito anteriormente, estão relacionados com o controle da expressão de diversos fatores que regulam a atividade e o crescimento da próstata e pode, também, estar envolvido com processos que regulam o crescimento tumoral, como indução da proliferação, apoptose e angiogênese (RAJPUT & SEHGAL, 2012). Por esse motivo, desde a década de 40 até os dias de hoje, a privação androgênica tem sido usada como principal tratamento para o câncer de próstata (HUGGINS & HODGES, 1941).

Apesar de todas as vantagens da terapia por privação androgênica (TPA), utilizada como tratamento principal ou como coadjuvante aos tratamentos pós-prostatectomia ou radioterapia, muitos efeitos adversos são observados, uma vez que os andrógenos são muito importantes para o funcionamento de diversos aspectos do metabolismo. Uma das consequências diretas da TPA é o hipogonadismo, que é acompanhado pela perda de massa muscular e força, aumento da massa gordurosa, disfunções sexuais, sintomas vasomotores, diminuição da qualidade de vida, anemia, perda óssea, resistência à insulina, diabetes e doenças cardiovasculares (COLLINS & BASARIA, 2012). Além disso, um dos grandes desafios atuais consiste em lidar com tumores, especialmente os metastáticos encontrados em tecidos distantes da próstata, que desenvolvem independência androgênica, isto é, são capazes de progredir mesmo em indivíduos mantidos sob privação de andrógenos. Curiosamente, duas explicações para o motivo dessa independência podem estar na própria privação androgênica ou mudança de comportamento do AR (SHARIFI, 2013). No primeiro caso, a privação de andrógenos pode favorecer a seleção de células tumorais que apresentam amplificação do AR, ao passo que células com quantidade mínimas do receptor perecem. Como consequência, esse tumor continua sendo dependente de andrógenos, mas como há uma expressão exacerbada de AR, ele continua sendo estimulado mesmo que as concentrações de andrógenos sejam pequenas. Nesse caso, o tratamento responderia melhor a terapias com antiandrógenos. No segundo caso, o AR pode sofrer mutações ou apresentar polimorfismos que têm como consequência a hipersensibilidade aos andrógenos, a ligação promíscua a outros fatores não androgênicos que desencadeiam a resposta do AR ou, ainda, ganho de função do receptor. Nesses casos, a TPA poderia contribuir para a progressão tumoral exercendo uma pressão seletiva que favoreça tumores com clones de AR que atuam em ambientes com escassez de andrógenos (TAPLIN &

HO, 2001). Assim, a mutação não seria a causa do início do câncer em si, mas apenas seria notada em situações tardias, com metástases em locais distantes. Outras situações atualmente discutidas são: a possibilidade de ocorrência da biossíntese de andrógenos localmente nos tumores prostáticos, a partir de precursores inativos; alterações em coativadores de receptores hormonais; envolvimento do AR no aumento da movimentação de células cancerosas, através da interação com a filamina A observada em células metastáticas (SHARIFI, 2013; ZAZZO et al., 2015).

A despeito de serem mais recentes, estudos também têm relacionado os receptores de estrógenos (ER) com o câncer de próstata, uma vez que estrógenos em combinação com andrógenos seriam capazes de induzir a transformação prostática e a progressão tumoral (ZAZZO et al., 2015). Uma das evidências para essa hipótese reside no fato de alguns grupos étnicos apresentarem maior propensão ao câncer de próstata que outros. Homens negros possuem maiores taxas de estrógenos e sofrem mais de câncer de próstata que caucasianos, apesar de ambos apresentarem taxas de testosterona semelhantes. De maneira semelhante, a exposição a altas taxas de estrógenos ou desreguladores hormonais com atividade estrogênica, como o bisfenol A, durante o desenvolvimento embrionário provoca risco aumentado de alterações prostáticas na prole (TAPLIN & HO, 2001; ZAZZO et al., 2015). Além disso, durante o envelhecimento, fase em que o câncer de próstata se torna mais comum, o homem apresenta queda nos níveis de testosterona enquanto os níveis de estrógeno permanecem constantes, relação esta que pode ser mais importante para a instalação e progressão tumoral na próstata que os níveis de cada um dos hormônios em si (VERMEULEN et al., 2002; PRINS & KORACH, 2008). Cabe ressaltar que os ER, nas suas duas isoformas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), são encontrados na próstata, classicamente confinados aos compartimentos estromal e epitelial, respectivamente, e que desde a formação da próstata no período embrionário a sinalização cruzada entre mesênquima e epitélio desempenha papel indispensável para o desenvolvimento prostático (HAYWARD et al., 1996; THOMSON, 2001; MARKER et al., 2003).

De maneira semelhante ao AR, os ERs também modulam a expressão de genes após se ligarem ao hormônio, por uma cascata complexa de sinalização, podendo induzir por diferentes vias a proliferação celular e atuar na instalação de tumores. Entretanto, o fato de camundongos *knockout* para ER $\alpha$  não desenvolverem câncer de próstata e da ativação do ER $\beta$  estar relacionada com a apoptose em células malignas tem levantado a possibilidade de que a proliferação prostática induzida por estrógenos esteja relacionada mais com o ER $\alpha$  do que com o ER $\beta$  (PRINS & KORACH, 2008; ZAZZO et al., 2015). Todavia, os mecanismos que

envolvem os ERs são menos conhecidos, e ainda são necessárias novas abordagens experimentais para esclarecer o papel dos ERs na dinâmica tumoral prostática, especialmente com a novidade representada pelo recém-descrito ER, GPR30, que, sugere-se, estaria relacionado com a progressão do câncer independente de andrógenos, uma vez que não somente promove respostas fisiológicas após a ligação ao hormônio como também atua na transcrição de genes (PROSSNITZ & MAGGIOLINI, 2009).

### 1.3 N-METIL-N-NITROSOUREIA (MNU)

A MNU (figura 1.4) pertence à classe de agentes alquilantes, compostos químicos altamente reativos que introduzem radicais alquilas em moléculas biologicamente ativas impedindo seu funcionamento apropriado (MeSH, 2017). Este composto, assim como outras nitrosoureias, foi estudado com vistas ao desenvolvimento de medicamentos quimioterápicos, devido seu potencial citotóxico quando utilizado isoladamente ou em combinação com outros compostos (EMANUEL et al., 1974; KOLARIĆ, 1977). No entanto, o uso da MNU também foi relacionado com o surgimento de tumores em diversos órgãos de modelos experimentais (KELLY et al., 1968; KEMPF & IVANKOVIC, 1986). Por esta razão, atualmente a MNU tem sido utilizada em estudos sobre genética, mutagênese e indução carcinogênica (EPA AIR TOXICS, 2017).

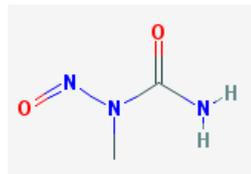


Figura 1.4 Estrutura molecular da N-metil-N-nitrosoureia (fonte: imagem adaptada da Internet<sup>2</sup>).

Trata-se de um potente agente carcinogênico que promove metilação direta de macromoléculas, inclusive proteínas e DNA, elevando a concentração intracelular de O<sup>6</sup>-metilguanina, que pode se ligar ao material genético desempenhando papel citotóxico e recombinante (KAINA et al., 2007). Assim, a MNU pode contribuir para o aumento do risco de câncer, afetando uma variedade de órgãos em que o desenvolvimento de neoplasias parece ser influenciado por agentes promocionais, por exemplo, tumores de mama e intestino influenciados por dietas ricas em gordura insaturada (CHANG et al., 1977) e tumores de bexiga

<sup>2</sup> Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em abr. 2017.

associados a metanossulfonato de metila (TUDOR et al., 1984). O composto em questão também contribuiria com a angiogênese, proliferação e apoptose, eventos que, embora estejam temporal e espacialmente separados durante a progressão tumoral, estão intimamente relacionados (LIAO et al., 2002). Dessa forma, parece comum que a MNU sensibilize muitos órgãos e que o tipo e sítio tumoral desenvolvido por cada animal poderia ser determinado pelo agente promotor e possivelmente pela linhagem em investigação (GONÇALVES et al., 2010).

Por este motivo, a MNU tem sido uma valiosa alternativa aos modelos experimentais representados por animais geneticamente modificados. Estes modelos são programados para desenvolverem, por exemplo, tumores prostáticos, os quais permitem os estudos diretamente relacionados com o câncer de próstata ou as neoplasias intra-epiteliais prostáticas, mas falham quando o objetivo é estudar meios de quimioprevenção ou os agentes promocionais dessas condições (BOSLAND, 1999). O composto tem sido empregado em protocolos que testam a capacidade de indução do câncer em curto prazo por agentes promotores (POLLARD & LUCKERT, 1986 e 1987; POLLARD et al., 1989; POLLARD, 1992; MCCORMICK et al., 1998; GONÇALVES et al., 2010; PEIXOTO et al., 2016) ou então em protocolos que testam a capacidade quimiopreventiva de compostos anticâncer, quando estes inibiriam a ação da MNU (BOONE et al., 1992; BOSLAND, 1999; BANUDEVI et al., 2011; KUMAR et al., 2012; SANCHES et al., 2013).

Diversos tecidos ou linhagens de células em cultura vêm sendo utilizadas como alvo da ação da MNU como agente carcinogênico, tais como tecido mamário, sistema nervoso central, ovário, útero, fígado, intestinos delgado e grosso e retina (KOESTNER, 1990; FAUSTINO-ROCHA et al., 2015; YOSHIZAWA et al., 2016). Especificamente em relação ao câncer prostático, o protocolo mais utilizado é a conjugação da MNU com a testosterona, considerada um potente promotor de neoplasias. Bosland (2014) mostrou que, sozinha, a testosterona aumentou a frequência de carcinomas prostáticos de 10% a 18%, enquanto que, combinada com a MNU, a indução subiu para 50% a 71%. Esse fato suscita questionamentos acerca das atuais terapias hormonais a base de testosterona oferecidas a homens de meia idade e idade avançada, bem como o abuso de anabolizantes esteroidais, frequente entre praticantes de atividades físicas. Segundo estudo feito com diversas linhagens de células em cultura de diferentes modelos experimentais, a carcinogênese promovida por esse método pode ocorrer por vias diversas (CONDON et al., 1999). Em gerbilos, o referido protocolo reduziu o tempo de latência do câncer prostático no lobo ventral, com clara transição de lesões pré-malignas para malignas, ainda que o lobo dorsolateral da próstata seja o mais afetado. Aparentemente,

isso explica que podem existir diferentes vias de instalação e progressão do câncer entre os diferentes lobos (GONÇALVES et al., 2013).

Em humanos, testes mostraram que a MNU é capaz de induzir a transformação maligna em células prostáticas (RHIM et al., 1997). Um possível meio de atuação envolveria a ativação da sinalização por AKT, cuja expressão aumentou concomitantemente à redução da expressão de AR, segundo experimento realizado por Liao e colaboradores (2005). A queda da expressão de AR em células neoplásicas está relacionada com a independência androgênica tumoral.

#### 1.4 MODELO EXPERIMENTAL: *Meriones unguiculatus*

Os gerbilos são roedores murídeos da subfamília Gerbillinae. A variedade utilizada neste estudo é conhecida como gerbilo da Mongólia, gerbilo de laboratório ou rato do deserto (figura 1.5), pois são encontrados nas regiões áridas da China e da Mongólia, tendo sido introduzidos na América para uso experimental em meados da década de 50 (SCHWENTKER, 1963). Esses animais são caracterizados por possuírem uma cauda longa e totalmente coberta por pelos, garras fortes empregadas na construção de abrigos e galerias, e membros posteriores alongados, usados para saltar, além de permitir a manutenção de uma postura semiereta. Podem apresentar diversas cores, que variam entre branco, amarelo, preto, malhado ou aguti, a cor mais frequentemente observada. São dóceis em cativeiro, resistentes em manipulações e possuem micção infrequente, uma adaptação ao clima desértico. Além disso, os gerbilos possuem grande capacidade reprodutiva e ciclos de vida rápidos, produzindo grande quantidade de descendentes que se tornam sexualmente maduros em poucas semanas de vida (TABOGA et al., 2009).



Figura 1.5 Modelo experimental utilizado no presente trabalho, o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) em caixa de polietileno (fonte: imagem adaptada da Internet<sup>3</sup>)

<sup>3</sup> Disponível em: <[www.clasf.com.br/q/esquilos-mongolia-gerbil/](http://www.clasf.com.br/q/esquilos-mongolia-gerbil/)> Acesso em abr. 2017

Por todas essas características e por apresentarem um tamanho intermediário quando comparado aos camundongos e ratos, o que facilita sua manipulação, são excelentes para uso em pesquisa e manutenção em biotério, razão pela qual seu uso como modelo experimental tem se disseminado para além dos Estados Unidos da América (TABOGA et al., 2009). Dentre as várias áreas de pesquisa que têm empregado o uso dos gerbilos, podemos citar estudos em imunologia (JEFFERS et al., 1984; NAWA et al., 1994), fisiologia (NOLAN et al., 1990), culturas de células (MORITOMO et al., 1991) e morfologia (SANTOS & TABOGA, 2006; ROCHEL et al., 2007).

Adicionalmente a todas essas vantagens já citadas, os gerbilos da espécie *Meriones unguiculatus* tem se revelado um bom modelo para o estudo da próstata, uma vez que a anatomia e histologia prostáticas desse roedor traz semelhanças com a próstata humana, especialmente no que concerne à compacidade dos lobos, mais evidente que em outros modelos comumente utilizados (figura 1.6). Nos ratos e camundongos, a glândula prostática apresenta lobos facilmente distinguíveis, enquanto no gerbilo em questão, eles são parcialmente fundidos, embora divididos em lobos ventral (VL), dorsal (DL), dorsolateral (DLL) associados a uma glândula coaguladora (CG) (PRICE, 1963; ROCHEL et al., 2007). Com isso, é possível estabelecer situações experimentais que permitem a correlação da morfofisiologia prostática do gerbilo com a humana, o que pode auxiliar o entendimento de questões importantes para a biologia reprodutiva, desde a histoarquitetura do órgão, passando pelos mecanismos moleculares comuns ao seu funcionamento, até a manutenção e ou quebra da homeostase, responsável pela promoção de desordens prostáticas variadas que podem influenciar fortemente a qualidade de vida de homens e mulheres.

Além disso, as fêmeas dos gerbilos também têm sido empregadas nos estudos relacionados à próstata feminina, uma vez que a glândula é encontrada em cerca de 90 % das fêmeas adultas, com um tamanho consideravelmente maior que em outros roedores e uma semelhança morfológica e funcional com o VL nos machos e com a próstata da mulher. Essas características interessam muito nos estudos comparativos que objetivam entender a importância dessa estrutura para a biologia reprodutiva e a saúde femininas (TABOGA et al., 2009).

Por fim, uma outra característica importante no modelo experimental utilizado é a alta incidência de lesões prostáticas espontâneas, as quais incluem inflamações, atrofia, hiperplasias, neoplasias intra-epiteliais e carcinomas (CAMPOS et al., 2008; CUSTODIO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010 e 2013), entre outras. As razões para essa frequência de

lesões ainda não são bem compreendidas, o que faz do gerbilo um modelo promissor para estudos relacionados às doenças que acometem a próstata.

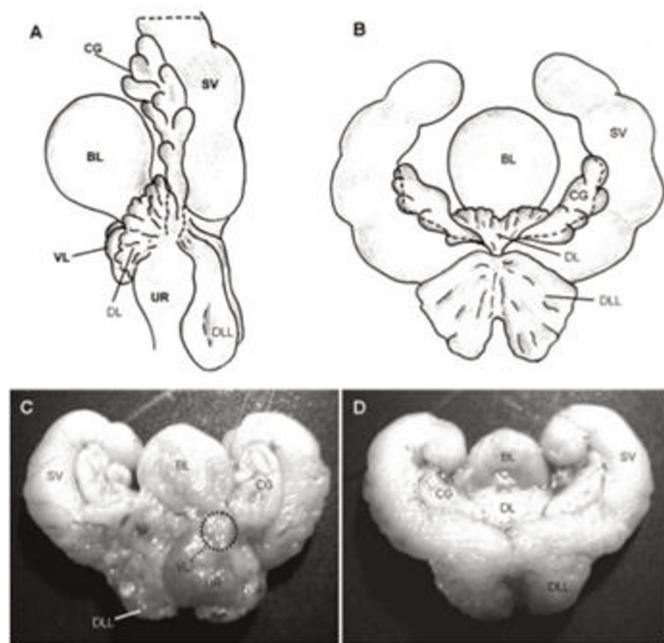


Figura 1.6 Complexo prostático de machos adultos do gerbilo da Mongólia demonstrando a compactidade dos lobos. Vista lateral (A), dorsal (B e D) e ventral (C). BL: bexiga, CG: glândula coaguladora, DL: lobo dorsal, DLL: lobo dorsolateral, SV: vesícula seminal, VL: lobo ventral, UR: uretra. (Reproduzido de ROCHEL et al., 2007).

### 1.5 INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O FITOTERÁPICO *Tribulus terrestris*

O gênero *Tribulus*, da família Zygophyllaceae, é composto por cerca de 20 espécies distribuídas pelo mundo, das quais, pelo menos três, são amplamente utilizadas por medicinais tradicionais como medicamento. Dentre elas, destaca-se o *Tribulus terrestris* (TT), uma planta arbustiva anual, encontrada no Mediterrâneo, em regiões de clima desértico e subtropical, tendo sido observada na Índia, China, Estados Unidos da América, México, Espanha e Bulgária (CHHATRE et al., 2014; NEYCHEV & MITEV, 2016). Sua morfologia pode variar dependendo da região, mas apresenta, geralmente, coloração esverdeada e flores amarelas. Por conta do aspecto irregular e das estruturas pontiagudas do fruto, a planta também é conhecida, regionalmente, por videira-de-espinhos (*puncturevine*), erva-de-espinhos (*caltrop*), cabeça-de-bode (*goat head*), cabeça-de-touro (*bull's head*), noz-carrapicho (*ground burr nut*) e chifre-do-diabo (*devil's thorn*). Outras nomenclaturas são encontradas, devido aos seus supostos efeitos farmacológicos, tais como *Gokhshura*, na medicina Ayurvedica indiana, *Ci Ji Li* na medicina tradicional chinesa e, no Brasil, como Viagra natural ou abrolho (WANG et al., 1997;

KOSTOVA & DINCHEV, 2005; ADAIKAN et al., 2001; ANDROSTEN®, 2013 – tradução nossa).

Sobre sua utilização nas medicinas tradicionais, o TT é um fitoterápico conhecido e utilizado há muito tempo em culturas como a indiana, chinesa, búlgara e unani (árabe) (CHHATRE et al., 2014). Suas formas de indicação e utilização são inúmeras, muitas delas com respaldo em análises experimentais publicadas em diversos artigos científicos. Em revisões publicadas sobre a planta, é possível identificar seu uso tradicional como tônico, anti-hipertensivo, antidepressivo, analgésico, diurético, imunotivador, promotor de absorção intestinal, no combate a cálculos renais e infecções urinárias, no controle do diabetes, na prevenção da hiperlipidemia e controle do colesterol, na palição de doenças vasculares, no combate ao câncer e inúmeros outros (UKANI et al., 1997; ADIMOELJA, 2000; ADAIKAN et al., 2001; CHU et al., 2003; KOSTOVA & DINCHEV, 2005; AMIN et al., 2006; HO & TAN, 2011; MALVIYA et al., 2011; MOHD et al., 2012; SINGH et al., 2012; BHATIA et al., 2014; CHHATRE et al., 2014; NEYCHEV & MITEV, 2016).

Em todas as medicinas tradicionais citadas, o TT é largamente utilizado como afrodisíaco, sendo indicado para casos de disfunção erétil e baixa qualidade do esperma. Estudos realizados com animais e humanos mostraram um papel importante do vegetal em diversos aspectos da sexualidade, reforçando algumas das proposições etnofarmacológicas, (ADAIKAN et al., 2001). Mais detalhes a respeito do uso do TT para fins reprodutivos serão dados no Capítulo I desta tese, uma vez que uma extensa revisão bibliográfica foi realizada a respeito dos experimentos realizados sobre o papel do fitoterápico na biologia reprodutiva.

A primeira patente de fitoterapia produzida a partir do TT pertence à indústria farmacêutica búlgara Sopharma. Tribestan® é um medicamento desenvolvido a partir da extração de TT, contendo pelo menos 45% de protodioscina (figura 1.7), uma saponina esteroidal, amplamente utilizado em pesquisas médicas e tratamentos de disfunções sexuais (ISMAIL et al., 2014). As saponinas constituem um grupo diverso de produtos naturais bioativos encontrados principalmente em dicotiledôneas e alguns organismos marinhos. Elas se comportam como glicosídeos anfipáticos. São isoprenóides, especificamente derivados de triterpenos ou esteroides (OSBOURN et al., 2011). Devido ao fato de acreditar-se que todos os outros componentes encontrados no extrato fossem farmacologicamente inativos, atribuiu-se à protodioscina o protagonismo da ação do medicamento a base de TT (ADAIKAN et al., 2001).

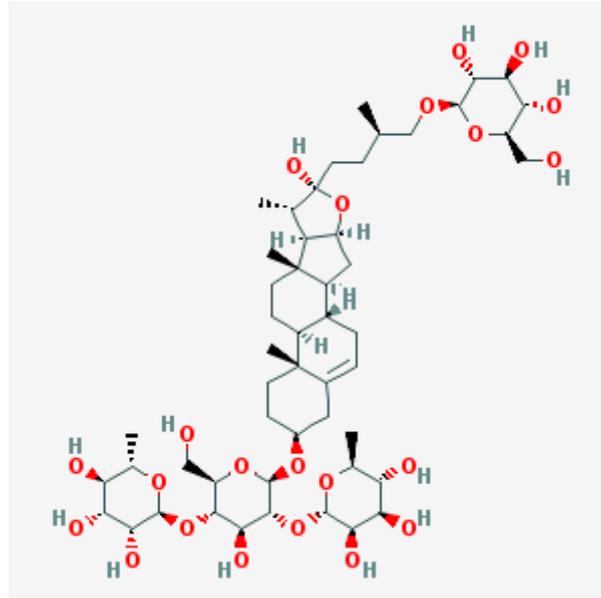


Figura 1.7 Fórmula estrutural da Protodioscina, saponina esteroidal apontada, classicamente, como o principal princípio ativo do TT. Fórmula molecular  $C_{51}H_{84}O_{22}$ , peso molecular 1049.211 g/mol (fonte: imagem da Internet<sup>4</sup>).

Desde a primeira patente até hoje, o TT tem sido comercializado com a promessa de interferir no metabolismo de andrógenos, elevando as taxas de LH, testosterona, DHEA e DHT. Por esta razão, o extrato herbal passou a ser utilizado massivamente também por praticantes de atividades físicas em busca de ganhos estéticos e de desempenho, com base no ganho de testosterona a partir de uma alternativa natural e legal aos anabolizantes (ANTONIO et al., 2000; BROWN et al., 2000; MASON et al., 2001; ROGERSON et al., 2007). Em uma busca rápida pela Internet, usando o termo ‘Tribulus terrestris’, é possível encontrar uma infinidade de artigos relacionando-o ao ganho de massa muscular e perda de peso, além da melhora no estado geral de saúde e disposição. Muitos desses sites trazem referências a estudos científicos que comprovariam a eficácia do TT, justificando o seu efeito através do incremento nas taxas de andrógenos. No entanto, a maioria dessas discussões está ligada a sites de revendedores de suplementos ou blogs dedicados a prática esportiva conhecida como *bodybuilding*, de forma que é escassa a bibliografia científica e imparcial sobre o assunto (QURESHI et al., 2014)

Há também que se considerar os fatores que tornam os ditos “medicamentos naturais” tão populares. Diz o senso comum que, por serem naturais, eles não oferecem risco, não causam efeitos colaterais indesejáveis, costumam ter baixo custo e são facilmente encontrados. De fato, o uso é influenciado pela cultura e, frequentemente, os medicamentos

<sup>4</sup> Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em abr. 2017

naturais são os primeiros a serem utilizados (YABESH et al., 2014). A grande procura por medicamentos naturais que atuam no desempenho sexual reforça a necessidade de se catalogar as plantas cujo uso é encorajado, e de se validar, cientificamente, os efeitos dessas terapias (MALVIYA et al., 2011)

Em contrapartida, a afirmação de que o TT influencia os níveis de andrógenos ou seus precursores tem encontrado pouco apoio no meio acadêmico apesar de ampla divulgação dessa informação nos sites leigos. Os estudos iniciais com humanos são controversos, pois quando indicam aumento dos níveis de hormônios sexuais, eles não extrapolam os limites fisiológicos normais para esses hormônios (NEYCHEV & MITEV, 2016). Estudos mais recentes corroboram essa ideia, mostrando que o uso de TT em atletas ou em adultos saudáveis não causam grandes mudanças no perfil hormonal, nem mesmo na performance esportiva, como defendido por leigos ou pelos responsáveis diretos ou indiretos pela popularização do fitoterápico (ANTONIO et al., 2000; NEYCHEV & MITEV, 2005 e 2016; ROGERSON et al., 2007; SAUDAN et al., 2008; MARTINO-ANDRADE et al., 2010; POKRYWKA et al., 2014). No entanto, alguns defensores do uso do TT sugerem que sua eficácia seria maior em indivíduos mais velhos, atuando na regulação hormonal da testosterona, mantendo os níveis do hormônio mais altos com o passar dos anos, já que eles decaem com o envelhecimento (ANDROSTEN®, 2013; QURESHI et al., 2014).

Uma possível explicação para a gama de resultados controversos acerca da ação do TT é que não existe uma padronização dos experimentos realizados com a planta. Cada uma das pesquisas realizadas conta com diferentes modelos experimentais, em diferentes idades e condições de saúde, com dosagens distintas, diferentes formas de aplicação, diferentes tempos de tratamentos e formulações diversas, que incluem desde o TT puro e cru, até o TT processado por indústrias farmacêuticas e ou combinado com outros componentes, muitas vezes com reconhecido poder androgênico, o que invalidaria a ação do TT propriamente dito. São, ainda, analisados diferentes tipos de hormônios: totais, livres, séricos, excretados na urina, o que dificulta as análises comparativas. Além disso, é comprovada a diferença de composição entre plantas colhidas em regiões geográficas distintas e dos produtos obtidos a partir de diferentes formas de extração, podendo o extrato, em alguns casos, não apresentar a protodioscina, inicialmente coroadada como a molécula ativa da planta (KOSTOVA & DINCHEV, 2005; DINCHEV et al., 2008; IVANOVA et al., 2011; CHHATRE et al., 2014; QURESHI et al., 2014; NEYCHEV & MITEV, 2016).

Por fim, há que se considerar a possibilidade de que os efeitos advindos do uso do TT possam ser resultado de mecanismos combinados, e não de um único mecanismo isolado.

Da mesma forma, o destaque dado à protodioscina pode ser inadequado, uma vez que muitas outras moléculas, inclusive outras saponinas esteroidais, vem sendo descritas (XU et al., 2001; KOSTOVA et al., 2002; SUN et al., 2002; HUANG et al., 2003; LV et al., 2008; XU et al., 2008; SU et al., 2009; XU et al., 2009; LIU et al., 2010; KOZLOVA et al., 2011; CHEN et al., 2012). Deve-se, ainda, ressaltar a importância do uso consciente das substâncias naturais, as quais podem oferecer riscos tanto quanto as substâncias sintéticas, especialmente em casos em que a atuação dos compostos envolvidos não é clara, como é o caso do TT (QURESHI et al., 2014).

## **2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA**

---

Sabe-se que o câncer é uma doença de origem multifatorial e suscetível à influência de fatores genéticos, ambientais, comportamentais e até econômicos. Alguns hábitos podem contribuir para a maior incidência do câncer, como o tabagismo, a obesidade, o consumo excessivo de carnes vermelhas e a exposição a agentes físicos e químicos com potencial carcinogênico, como a radiação solar e o consumo de compostos químicos que afetam o material genético (INCA, 2016). Da mesma forma que algumas substâncias podem interferir negativamente no metabolismo celular, outras substâncias podem ter um efeito protetor ou potencializador em tratamentos visando evitar a instalação ou o controle da progressão de diferentes tipos de cânceres (POPPEL & TOMBAL, 2011). Por esta razão, muitos esforços têm sido empregados no sentido de comprovar a eficácia do uso de ervas, alimentos, suplementos e compostos funcionais, ou entender os mecanismos pelos quais esses agentes protetores atuam. Dentre os compostos promissores estudados encontram-se as saponinas, presentes em animais marinhos, na soja e seus derivados, além de outros vegetais como o ginseng e o TT (GAYNOR, 2003; LÖW et al., 2007; KIM, 2008; YAN & SPITZNAGEL, 2009; CHEN et al., 2011; POPPEL & TOMBAL, 2011).

Acredita-se que um grupo especial de saponinas pode atuar de maneira similar a hormônios esteroides, produzindo assim algum efeito sobre órgãos sensíveis a esses hormônios ao interferir na sua homeostase de forma positiva, atuando como substâncias quimioprotetoras em relação ao câncer (KIM, 2008). Dentre as atividades antitumorais desses compostos estão: a indução de apoptose ou necrose, efeitos antiproliferativos, anti-invasivos, antiangiogênico e antimetastático (YUE et al., 2007). Entretanto, muitos estudos ainda são necessários para que se entendam os mecanismos pelos quais as saponinas atuariam na prevenção ou no tratamento do câncer. Igualmente, há carência de estudos que corroborem a eficácia dessas moléculas no combate a esta doença.

Uma das variedades de saponinas em uso atualmente é a protodioscina, presente no TT. A interferência nos níveis de andrógenos, delegada a este fitoterápico, ainda não é claramente explicada e o real papel desse composto ainda é motivo de controvérsias entre os pesquisadores, os quais se dividem entre os que defendem uma ação direta do TT no metabolismo androgênico, e os que questionam essa possibilidade. No entanto, no Brasil e em diversos países, a comercialização e o uso dos extratos de TT são permitidos. Sob o véu da segurança inerente aos produtos naturais, que nem sempre é real, este produto tem sido indicado

por médicos no tratamento auxiliar de disfunções sexuais de naturezas diversas. A promessa da elevação dos níveis de testosterona endógena fez com que o TT passasse a ser massivamente consumido por praticantes de atividades físicas que buscam ganho de força, massa muscular e desempenho, como uma alternativa natural, legal e segura aos anabolizantes. Isto é, apesar de toda a controvérsia tangente ao uso do fitoterápico e seus efeitos no metabolismo androgênico, é grande o número de pessoas que o utilizam com esse propósito. Além disso, este produto é facilmente encontrado em farmácias e lojas de suplementação e, por ser utilizado como um extrato natural e não ser considerado como um medicamento, escapa ao controle rigoroso dos órgãos de fiscalização.

Diante deste cenário, se o uso do extrato de TT tem sido relacionado a alterações nos níveis de hormônios esteroides como a testosterona e DHT e sabendo que o equilíbrio entre esses hormônios está intimamente envolvido com o funcionamento e homeostase da glândula prostática (TAPLIN & HO, 2001), julgamos importante avaliar o efeito dessa substância sobre a próstata de animais adultos, a fim de verificar que alterações morfológicas e fisiológicas seu uso poderia acarretar. É necessário saber se o fitoterápico produz efeitos positivos ou nocivos na próstata de indivíduos saudáveis apesar de seus benefícios relacionados à fertilidade e libido.

Além disso, para confirmar se é possível atribuir ao uso dessas substâncias um caráter protetor ou auxiliar no tratamento do câncer, estudamos seus efeitos sobre as glândulas prostáticas de animais que sofreram indução do câncer através do carcinógeno MNU. A escolha da MNU como agente carcinogênico tem base em estudos já realizados em nosso laboratório. Resultados positivos de indução do câncer de próstata foram alcançados usando o gerbilo da Mongólia como modelo experimental, sendo que lesões de grande importância, como neoplasias intra-epiteliais e adenocarcinomas, podem ser encontradas três meses após sua aplicação (GONÇALVES et al., 2010 e 2013).

Em suma, este trabalho versa sobre a hipótese de que o TT, caso seja mesmo capaz de alterar os níveis de testosterona, poderia interferir na homeostasia prostática, que depende do equilíbrio entre os hormônios esteroides. Além disso, em se alterando esse equilíbrio, o fitoterápico poderia interferir na instalação de lesões provocadas pelo carcinógeno MNU, a exemplo dos protocolos de indução de câncer consagrados que usam a conjugação entre MNU e testosterona.

Cabe destacar, ainda, que grande parte dos estudos de quimioprevenção do câncer por meio de agentes naturais utiliza células cancerosas em cultura, e não condições *in vivo*, o que torna o presente estudo, que preza por uma abordagem morfofuncional, uma novidade nessa

área. Com este trabalho, poderemos oferecer subsídios experimentais para responder se o mesmo efeito observado em cultura é também observado em organismos vivos.

Por fim, além de ajudar a entender os efeitos uso do TT, o presente estudo se propôs a auxiliar no esclarecimento dos mecanismos pelos quais esses efeitos aconteceriam. Estes resultados serão de grande importância para o entendimento dos mecanismos de atuação do referido fitoterápico, assim como para a observação de possíveis efeitos colaterais provenientes do seu uso.

### 3 OBJETIVOS

---

Tendo em vista as informações apresentadas, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do uso do extrato seco de *Tribulus terrestris*, Zygophyllaceae, sobre os níveis de testosterona e sobre a morfologia do lobo ventral da próstata de gerbilos machos intactos e submetidos ao modelo de indução tumoral pelo agente carcinogênico MNU.

Objetivos específicos:

- Determinar se o *Tribulus terrestris* é eficiente como indutor da produção de testosterona no gerbilo da Mongólia, nas condições experimentais propostas, a fim de oferecer subsídios experimentais favoráveis ou contrários ao potencial androgênico do fitoterápico;
- Analisar se o fitoterápico é capaz de causar alterações biométricas em órgãos andrógeno-responsivos;
- Analisar as respostas do lobo ventral da próstata em diferentes intervalos de tempo de aplicação do fitoterápico através de alterações na frequência relativa dos compartimentos prostáticos (epitelial, luminal e estromal muscular e não-muscular);
- Testar o potencial indutor ou protetor do fitoterápico em relação ao câncer de próstata nos animais intactos e submetidos à indução carcinogênica pela MNU, através da análise da multiplicidade de leões pré-malignas e malignas no lobo ventral da próstata do gerbilo, a fim de corroborar ou confrontar resultados já observados *in vitro*;
- Estudar os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorreriam na glândula, através da análise do receptor hormonal AR, dos indicadores de proliferação e apoptose PCNA e TUNEL, respectivamente, e da proteína relacionada ao câncer p63;
- Oferecer subsídios experimentais que contribuam para a investigação acerca da segurança do consumo de *Tribulus terrestris* em relação à próstata, órgão intimamente relacionado com o equilíbrio hormonal.

## 4 CAPÍTULO I

---

### A Review on the role of *Tribulus terrestris* in the reproductive biology

Manuscript submitted to the “**Journal of Dietary Supplements**”.

#### **Authors Information:**

Diego Augusto Lopes da Silva, PhD<sup>a</sup>; Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, PhD<sup>b</sup>; Sebastião Roberto Taboga, PhD<sup>c</sup>.

<sup>a</sup>Institute of Biology, Campinas State University, PO Box 6109, Bertrand Russel Av, zip code 13083-865 Campinas/SP, Brazil. E-mail: diegolopes\_silva@yahoo.com.br

<sup>b</sup>Department of Histology, Embryology and Cell Biology, Goiás Federal University, PO Box 1317400197, Esperança Av, zip code 74690-900, Goiânia/GO, Brazil. E-mail: fernanda\_alcantara@ufg.br

<sup>c</sup>Department of Biology, Paulista State University, 2265 Cristóvão Colombo st, zip code 15054-000 São José do Rio Preto, Brazil. E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

#### **Authors Research Interests:**

The authors have experience in the field of reproductive biology, especially in subjects related to the morphology, physiology and endocrine regulation of male and female prostate.

#### **Corresponding author:**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Microscopy and Microanalysis Laboratory, Biology Department, IBILCE/UNESP  
2265, Cristóvão Colombo street, zip code 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

Tel +55-17-32212386; Fax +55-17-32212390

#### **Wordcount:**

Abstract – 224 words (1,461 space characters)

Main text – 7,454 words (48,085 space characters)

Number of tables – 3

Number of figures – 2

Number of Supplementary Tables – 9

### **Abstract**

The use of plants for the treatment of diseases is common in many cultures. In addition to the traditional appeal, the use of natural products is encouraged by easy access, low cost and for the believing that they pose no health risks. *Tribulus terrestris* is known in Indian, Chinese and Arabic traditional medicines and its use has spread throughout the world. Among the innumerable indications of use, this plant consumption is related to the improvement in sexual quality of life for supposedly raising serum androgen levels and acting on the balance of hormonal rates. Although this possibility is widely diffused among phytotherapeutic traders, studies on the effect of plant use on the hormonal profile present controversial results and its androgenic capacity has been questioned. However, many studies suggest that the use of this herb can bring significant improvements in several aspects of reproductive biology, such as protection against oxidative stress damage in reproductive tissues, improvement of erectile function and sexual performance, improvement in semen quality parameters and attenuation of symptoms common to adverse conditions such as menopause and polycystic ovary syndrome. Thus, this review aims to gather evidence about the role of *Tribulus terrestris* on reproductive biology and its possible mechanisms of action, offer subsidies for the evaluation of the safety of its use and point to new possibilities of research on this subject.

### **Keywords**

*Tribulus terrestris*, protodioscin, testosterone, nitric oxide, sexual dysfunctions, sexual hormones.

### **Abbreviations**

ACP: acid phosphatase; ALP: alkaline phosphatase; AR: androgen receptor; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; CC: corpora cavernosa; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; DHEA: dehydroepiandrosterone; DHT: dihydrotestosterone; ER $\alpha$ : estrogen receptor alpha; ER $\beta$ : estrogen receptor beta; FSH: follicle stimulating hormone; G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase; GABA: gamma aminobutyric acid; GTP: guanosine triphosphate; HO-1: heme oxygenase 1; ICP: intracavernous pressure; IGF-1R: insulin-like growth factor 1 receptor; KCl: potassium chloride; LDH: lactic dehydrogenase; LH: luteinizing hormone; L-NAME: L-arginine methyl ester; MDA: malondialdehyde; NADPH-d: dihydronicotinamide adenine

dinucleotide phosphate diaphorase; NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B; NO: nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; Nrf2: nuclear factor erythroid 2 – related factor 2; PCOS: polycystic ovary syndrome; SDH: succinate dehydrogenase; TT: *Tribulus terrestris*.

## **Introduction**

*Tribulus terrestris*: *from traditional medicines to the present day*.

Despite the unquestionable advancement of modern medicine, the use of natural products to treat health problems is still very common, especially in cultures with strong traditional appeal. In Brazil, for example, perhaps as a consequence of the great miscegenation of its people, traditional medicine has an important influence of the original indigenous folk and also of the peoples who established colonies in Brazilian lands, such as European, Africans, Japanese, Chinese and Arabs. It is not uncommon to find in the residences a collection of herbs used in infusions, patches, preserves, spices or for immediate consumption with the purpose of treating various symptoms, cultivated in what could be called "backyard pharmacies".

Currently, even though there is a large supply of medicated or instrumental treatments for various diseases, even in the most developed countries it is possible to observe an intensification of the demand for medicine considered natural, as the first and/or only form of treatment of diseases, or as adjunctive therapy co-administered with modern medicine (Adaikan, Gauthaman, & Prasad, 2001; Morvin Yabesh, Prabhu, & Vijayakumar, 2014). The use of natural products is encouraged because of easy access, for allegedly causing mild side effects, because of low cost and, obviously, historical and cultural appeal (Malviya et al., 2011). However, natural products have their action based on popular or religious knowledge and are little studied experimentally. In addition, because they are not considered as formal medicines, they have neglected the monitoring of their quality and biomedical efficacy, which causes risks, since these substances may not be functional in fact or can bring adverse health effects, which is even more dangerous (Pokrywka et al., 2014). For this reason, research is needed to prove the efficacy and safety of these therapies in order to validate or reject the traditional use of these substances (Malviya et al., 2011).

*Tribulus terrestris* (TT) fits in this case, since it is a phytotherapeutic rich in biologically active compounds, such as alkaloids and glycosides, known and used for a long time in cultures such as Indian, Chinese, Bulgarian and Arabic (Chhatre et al., 2014). Its forms of indication and use are numerous, many of them supported by experimental analyzes published in various scientific articles. Among the properties attributed to the plant, it is possible to identify its traditional use as tonic, aphrodisiac, antihypertensive, antidepressant,

analgesic, diuretic, immunoactivator, intestinal absorption promoter, in combating renal calculi and urinary infections, in diabetes control, in prevention of hyperlipidemia and control of cholesterol, in palliation of vascular diseases, cancer control and countless others (Ukani, Nanavati, & Mehta, 1997; Adimoelja, 2000; Chu et al., 2003; Kostova & Dinchev, 2005; Amin et al., 2006; Ho & Tan, 2011; Malviya et al., 2011; Mohd et al., 2012; Singh, Nair, & Gupta, 2012; Bhatia et al., 2014; Bahmani et al., 2016; Neychev & Mitev, 2016; Samani et al., 2016).

In Brazil, the dry extract of TT can be found under the name Androsten®, produced and marketed by Herbarium laboratory. According to the label of the drug (2013), it is standardized in at least 45% of steroidal saponins calculated as protodioscin, which is indicated to adjust the hormonal balance and increase sperm production in men. In females, the same drug may be indicated for attenuating symptoms of frigidity, ovarian endocrine sterility, climacteric and post-castration syndrome (Androsten®, 2013).

Recently, the use of this herbal medicine has spread beyond the one specified in the package leaflet, among physical activity practitioners, with the promise of improving physical or esthetic performance through the gain in testosterone (Antonio et al., 2000; Brown et al., 2000; Mason et al., 2001; Rogerson et al., 2007). In a quick Internet search using the term '*Tribulus terrestris*', it is possible to find a multitude of articles relating it to the gain of muscle mass and weight loss, as well as the improvement in the general health and disposition. Many of these sites refer to scientific studies that prove the efficacy of TT, justifying its effect by increasing androgen rates. However, most of these discussions are tied to supplemental reseller sites or blogs dedicated to the sporting practice known as bodybuilding, so there is little scientific and unbiased literature on the subject (Qureshi, Naughton, & Petroczi, 2014).

#### *Characterization of the plant*

The genus *Tribulus*, belonging to the family Zygophyllaceae, is composed of about 20 species distributed throughout the world, of which, at least three, are widely used by traditional medicines as medications (Chhatre et al., 2014). The taxonomic classification of this genus is not always clear, due to the great genetic and morphological variation within the populations. One of the most commonly used species is TT (Fig. 1), an annual shrub, found in the Mediterranean, in desert and subtropical climates, as a globally distributed aggressive colonizer, which is why it receives several regional names (Adaikan, Gauthaman, & Prasad, 2001). Its morphology may vary depending on the region, but usually presents with greenish coloration and yellow flowers. Because of the irregular appearance and pointed structures of the fruit, the plant is also known regionally by puncturevine, caltrop, goat head, bull's head,

ground burr nut and devil's thorn. Other nomenclatures are found, owing to their supposed pharmacological effects, such as *Gokhshura*, in Ayurvedic medicine, *Ci Ji Li* in traditional Chinese medicine and, in Brazil, as natural Viagra® or *Abrolho* (Wang et al., 1996; Adaikan, Gauthaman, & Prasad, 2001; Kostova & Dinchev, 2005; Androsten®, 2013).

This review aims to gather evidence about the role of TT on the reproductive system, reproductive biology and its possible mechanisms of action, offer subsidies for the evaluation of the safety of its use and point to new possibilities of research on the subject.

<Insert figure 1>

### **Effects of TT on Reproductive Biology**

In many traditional medicines, TT is widely used as an aphrodisiac and is indicated for cases of frigidity (without probable cause or caused by various health conditions), erectile dysfunction and poor sperm quality. Studies on animals and humans have shown an important role of the plant in several aspects of sexuality, reinforcing some of the ethnopharmacological propositions, but not all, with some rather controversial propositions persisting.

Initially, efforts were focused on obtaining extracts from different parts of the plant for the identification of its components, in view of the effects reported from its cultural use. The first patent of herbal medicine produced from TT belongs to the Bulgarian pharmaceutical industry Sopharma. Tribestan® is a drug developed through the extraction of TT, containing at least 45% of protodioscin, a steroidal saponin, widely used in medical research and treatment of sexual dysfunctions (Ismail et al., 2014). The saponins constitute a diverse group of natural bioactive products found mainly in dicotyledons and some marine organisms, which behave like amphipathic glycosides. They are isoprenoids, specifically derived from triterpenes or steroids (Osbourn, Goss, & Field, 2011). In the case of TT, protodioscin can be found throughout the plant, especially in the aerial parts, with a higher concentration in the fruits (Mathur & Sundaramoorthy, 2013). Due to the fact that all the other components found in the extract were believed to be pharmacologically inactive, the role of the TT-based drug was attributed to protodioscin (Adaikan, Gauthaman, & Prasad, 2001).

The steroidal nature of protodioscin fueled the belief that it would be responsible for changes in serum levels of steroid hormones. However, current research has pointed to new mechanisms of action of the active principle, since the assertion that TT would increase levels of sex hormones has found little support in the unbiased scientific literature. Next, we will address such mechanisms and what the accessed literature says about them.

*Mechanism of action classically proposed: hormonal effects*

The mechanism classically proposed for the action of TT in men includes three main effects (Fig. 2): (1) stimulation of brain androgen receptors (AR), which would enhance luteinizing hormone (LH) releasing by the pituitary, stimulating Leydig, Sertoli and germinative cells, thus increasing the production of testosterone, the number of spermatids, spermatocytes and spermatogonia (Androsten®, 2013; Qureshi, Naughton, & Petroczi, 2014; Gauthaman & Adaikan, 2005). In this way, the increase of these brain AR would deceive the body's hormonal control, making it interpret that the androgen rates are lower than they should, leading to an increase in the production of endogenous testosterone (Qureshi, Naughton, & Petroczi, 2014). (2) Simulation, by the protodioscin, of 5 $\alpha$ -reductase enzyme, which is responsible for the conversion of testosterone to dihydrotestosterone (DHT), which would act not only on sexual behavior, but also on the production of red cells by bone marrow, muscle development, circulation improvement, oxygenation and overall well-being (Chhatre et al., 2014; Androsten®, 2013). (3) Elevation of the levels of dehydroepiandrosterone (DHEA), which acts on the immune system and is responsible for a sense of well-being and better self-esteem, and whose deficiency is related to erectile dysfunction (Androsten®, 2013; Adimoelja & Adaikan, 1997).

In contrast, the claim that TT influences levels of testosterone or its precursors has found little support in academia despite wide dissemination of this information on lay sites. Most studies with positive results for this statement have been conducted with animals and initial studies with humans are controversial and, when they indicate increased levels of sex hormones, they do not extrapolate the normal physiological limits for these hormones (Neychev & Mitev, 2016).

<Insert figure 2>

Regarding the first mechanism, it is difficult to find works that have studied the expression of hormonal receptors in the brain related to TT consumption. A study by Gauthaman and Adaikan (2005) showed a 67% increase in the localization of dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) and 58% of AR in rat brains. NADPH-d indicates the presence of neurons capable of signaling through the release of nitric oxide (NO), synthesized from the enzyme nitric oxide synthase (NOS). The authors attributed the elevation of the AR expression to the increase of testosterone, although

this hormone was not dosed in the study. However, elevated concentration of androgens would cause the reduction of the NOS-positive neuron marking, which contradicts the presented result. The justification given by the authors is that TT raises the concentration of androgens, which is compatible with the increase of AR, but does not prevent the aromatization of these hormones, which can lead to higher levels of estrogens, which is compatible with the increase of NOS-positive neurons (Gauthaman & Adaikan, 2005). This information is consistent with three studies conducted by Brown and colleagues, which tested androstenedione (Brown et al., 2000; Brown et al., 2001a) and androstenediol (Brown et al., 2001b) associated with other compounds used to aid androgen gain and to prevent their aromatization. In this way, it would be possible to avoid one of the main side effects of these hormonal therapies - estrogenization. In these experiments, although, such auxiliary compounds, among them TT, were not able to avoid aromatization.

Yin and coworkers tested the effect of TT on performance of strenuous exercise in rats and determined that the protocol used increased the levels of testosterone in the blood and AR in the gastrocnemius muscle and decreased levels of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) in the liver. The authors concluded that TT not only increases testosterone levels, probably due to a change in signaling of the AR and IGF-1R axis, but also can increase the localization of AR in target organs. In addition, the authors raise the possibility that androgens can be produced locally in the skeletal muscle from their precursor DHEA, due to the direct conversion of protodioscin into this androgen (Yin et al., 2016).

On the other hand, in a study conducted with rats who had estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome (PCOS), TT showed anti-androgenic activity *in vitro* and was able to attenuate the symptoms of PCOS, which is influenced by androgens, in a dose-dependent manner. The authors argue that the herbal medicine may be able to reduce testosterone levels, inhibit the transcriptional activity of AR, and thus prevent the physiological response to androgens *in vivo* (Sandeep, Bovee, & Sreejith, 2015). This possibility casts doubt on the ability of TT to alter the hormonal profile by increasing the expression and physiological response of ARs.

The controversy also concerns the discussion related to the ability of TT in raising LH levels (supplementary table 1). The oral consumption of TT influenced the levels of sex hormones and gonadotrophins in rats induced to morphine dependence. With the exception of follicle stimulating hormone (FSH), the dependence caused a decay of LH, testosterone, estrogen and progesterone levels. TT was able to recover, at levels close to the control animals,

all these hormones, except testosterone, which remained low although it showed a slight improvement in relation to the dependent group (Moghaddam et al., 2013).

In another experiment, Sharma and colleagues tested the role of TT ethanolic extract against the reproductive toxicity induced by  $\alpha$ -cypermethrin in Wistar rats. It was concluded that the herbal remedy is capable of recover the reproductive tissues from the damage caused by the toxic agent through its ability to reduce oxidative stress and by raising the levels of sex hormones and gonadotrophins (LH, FSH and testosterone). In this study, the authors further determined that TT alone was able to increase the weight of the testes and epididymis (which reflects the improvement in sperm production), improved the parameters analyzed for semen quality and induced the activity of anti-oxidants enzymes (Sharma, Huq, & Singh, 2013).

Results in favor of the increase in LH levels were also obtained by studying the aphrodisiac potential of a polyherbal formulation that included TT + six other herbs in albino rats. In addition to LH, the preparation also elevated FSH and testosterone, improved sexual behavior and performance, increased sperm count and the testis/body weight ratio (Sahoo et al., 2014). However, since it is a formulation with several active principles, there is no way to know the contribution of TT itself to the result found.

However, a large number of studies show that TT has no effect on LH levels or even cause them to be reduced. When studying the influence of two dosages of TT on the androgenic metabolism of young men, Neychev and Mitev concluded that the treatment did not cause any change in the serum levels of testosterone, androstenedione or LH. Since DHEA is a precursor of androstenedione, the authors also argue that the fact that androstenedione has not increased with treatment suggests that TT is also not able to raise DHEA levels by simply converting the protodioscin molecule (Neychev & Mitev, 2005).

Roaiiah and colleagues published two studies analyzing the effect of TT on the erectile function of men with partial androgen deficiency in advanced age (Roaiiah et al., 2016a), on the parameters of semen quality in men with infertility (Roaiiah et al., 2016b), and in sex hormone levels. In the first study, the authors observed that the treatment was efficient in increasing total and free testosterone levels and improving erectile function, although no change was observed in LH levels. Despite the promise of these data, in the second study TT was not effective in the treatment of idiopathic infertility, since it did not improve the analyzed sperm quality parameters, nor was it able to cause alteration in total and free testosterone or LH levels. Similar results for these hormones were obtained in the study performed with patients complaining of premature ejaculation. A combination of TT with tryptophan, *Satureja montana* and *Phyllanthus emblica* was able to improve ejaculation control, but did not cause significant

changes in testosterone and LH levels. The authors also concluded that the results obtained are mainly due to the synergistic action of tryptophan and *S. montana*, and the influence of TT remains uncertain (Sansalone et al., 2016).

A case report by Jameel and collaborators (2004) indicates an unexpected possibility for TT according to the classic form of use. A man sought medical help for presenting a persistent gynecomastia during the use of the herbal remedy. Laboratory tests showed that the patient had a drastic reduction in the levels of LH, FSH and testosterone, which were below normal physiological levels. After surgery for removal of the affected tissue and discontinuation of TT consumption, hormonal levels were markedly elevated and returned to normal physiological levels. As the medical picture did not recur, the authors concluded that TT can cause hormonal imbalance, culminating in gynecomastia (Jameel et al., 2004).

The second hormonal mechanism proposed for the action of TT is related to the elevation of DHT levels, due to the ability of the protodioscin molecule to facilitate the activity of the enzyme  $5\alpha$ -reductase or even to replace it in this function. However, it is difficult to find studies that have focused on the response of this hormone to TT (supplementary table 2).

In a study that analyzed the effect of TT on the hormonal levels of primates, rabbits and normal and castrated rats, researchers determined that the plant is able to raise testosterone, DHT and DHEA levels, and that this increase is more significant when the animals are in the hypogonadal state (Gauthaman & Ganesan, 2008). This statement agrees with the possibility that TT is more effective in maintaining hormonal balance than raising levels of certain hormones (Androsten®, 2013). The results with primates showed the momentary increase in testosterone and DHT levels after intravenous injection of TT extract, which returned to baseline levels over time. The authors also report an increase in DHEA levels but, only in the group with lower dosage and at an isolated moment of the analysis, this increase reaches a significant difference in relation to the control, which makes this result inconclusive. In rabbits, DHT levels were statistically increased, which was not observed with testosterone. In normal rats, the increase in testosterone and DHT were not statistically significant. In castrated rats, TT had half the ability to recover testosterone levels compared to testosterone cypionate. Similar results were found for DHT, but the increase was not statistically significant. Despite the conflicting results, the authors concluded that TT can be used in the treatment of erectile dysfunction, having a positive effect on sex hormones, probably due to the presence of protodioscin (Gauthaman & Ganesan, 2008).

In another study conducted with infertile men, Salgado and colleagues tested the effect of TT on the quality and physiological parameters of sperm. In addition to the

phytotherapeutic aid in fat loss and lean body mass gain, TT also increased DHT levels and improved some aspects of semen, such as the time of liquefaction, concentration and motility of spermatozoa. However, no change was observed in relation to the levels of DHEA, FSH, LH, free testosterone or prolactin (Salgado et al., 2017).

Contrary to these results, Nahata and Dixit evaluated the inhibitory capacity of herbal preparations over the enzyme  $5\alpha$ -reductase. The researchers concluded that TT is efficient in inhibiting the action of this enzyme, especially when using the aqueous extract (Nahata & Dixit, 2014). This result contradicts one of the classic mechanisms proposed for the action of the phytotherapeutic, casting doubt on the enzymatic capacity of protodioscin in the conversion of testosterone to DHT, a more potent and peripheral androgen and, consequently, in raising the levels of this hormone in the blood.

The third form of action of TT would be related to the increase of DHEA (supplementary table 3), due to the direct conversion of the protodioscin molecule, structurally very similar to that androgen (Adimoelja & Adaikan, 1997). Another possibility in the role of protodioscin in elevating DHEA levels is to stimulate the production of this hormone in the steroid pathway by the adrenals: the active principle of TT would be able to directly increase cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels, which can activate an esterase that acts in the conversion of cholesterol to pregnenolone, which is a precursor of steroid hormones and can be converted into DHEA (Gauthaman & Ganesan, 2008). Thus, by elevating DHEA levels, TT would contribute to a good general health, good self-esteem and better performance of sexual functions through the emotional and physiological mechanisms, due to the antagonistic effect of DHEA on gamma aminobutyric acid (GABA), which produces an inhibitory effect on sexual behavior (Gauthaman, Ganesan, & Prasad, 2003).

However, the claim that TT is able to raise DHEA levels are also controversial. In a review published by Mackay in 2004, the author criticizes the fact that many papers rely on this unsupported statement, based on poorly controlled experiments of questionable relevance. In addition, the author argues that there is still no clarity in the relationship between oral intake of DHEA and improvement in erection. Despite the TT's action on sexuality through steroid production being plausible, it is still not well determined. Finally, the author recalls the importance of considering multifactorial treatments, which recognize the importance of the psychological, nervous, vascular and endocrine factors on sexual health, in an integrated way (Mackay, 2004).

A study conducted in order to test the ability of TT to assist patients with erectile dysfunction suggests that, although it did not interfere with testosterone, FSH, LH and prolactin

levels, the herbal medicine was able to increase success in sexual relations of diabetic or non-diabetic men by 60%, together with the increase in circulating DHEA (Adimoelja & Adaikan, 1997). The authors relate the improvement in performance to the elevation of this hormone, due to the direct conversion of the protodioscin molecule.

Positive results were also obtained in a study that verified the efficacy and safety of the use of TT in the treatment of sexual dysfunction in women in Brazil. Besides concluding that the treatment was safe, since the adverse effects were rare and mild, the authors determined that the phytotherapeutic is efficient, since it improved the sexual function score of these women in standardized questionnaires and raised DHEA levels, despite of having caused the reduction of serum levels of total and free testosterone (Gama et al., 2014).

On the other hand, Martino-Andrade and colleagues have determined that the statement that TT has an androgenic and estrogenic effect *in vivo* is inconsistent. In addition to not causing significant changes in testosterone and DHEA levels, the extract did not produce stimulatory responses in the endocrine-responsive organs such as the prostate, seminal vesicle, uterus or vagina in males and females of Wistar rats. In contrast, the lower dose used in the study, 11 mg/kg body weight, improved the efficiency of spermatogenesis, since it increased the number of spermatids resistant to homogenization (Martino-Andrade et al., 2010).

Similarly, in order to confront the defense of two athletes caught in the antidoping test and who had stated that the alteration in the hormonal profile was due to the use of TT, Saudan and colleagues studied the effect of the same herbal preparation on two volunteers. The authors concluded that TT had no impact on the endogenous metabolism of testosterone, since the use of the substance did not significantly alter the rates of the markers used in the urine antidoping test, among which are products of the metabolism of LH and DHEA. These compounds remained below the tolerated limit, making the athletes' defense unviable. The authors conclude that TT cannot be considered as a direct precursor of testosterone nor an endogenous testosterone stimulator agent (Saudan et al., 2008).

Finally, the literature on the effect of TT on testosterone itself is also conflicting and evidence from well-controlled and impartial experiments in favor of the positive influence of the herbal medicine on the levels of this hormone are scarce (supplementary table 4).

The analysis of the acute and chronic effect of the use of lyophilized aqueous extract of TT on the sexual function of sexually sluggish albino rats showed that only chronic use was able to raise testosterone levels. Added to this effect, gain of body and testes weight allowed the authors to conclude that the extract has androgenic action. Chronic treatment was also able to increase sperm count. The authors argue that the number of spermatozoa is expected to

decline in cases of high testosterone levels due to the negative feedback mechanism, which did not occur in this study. The explanation given by the authors is that the property delegated to the TT to raise the levels of LH would have nullified the feedback. However, no dosage of LH has been reported (Singh, Nair, & Gupta, 2012).

Shalaby and Hammouda studied the protective and antioxidant effect of TT methanolic extract against sodium valproate-induced toxicity in the testes of rats. The treatment raised the levels of testosterone, FSH and LH. In addition, the researchers determined that the extract helped the weight gain of the testicles and seminal vesicles, improved some parameters of semen quality and testicular activity in intoxicated rats, alleviating the degenerative effects of sodium valproate. These findings allowed the authors to conclude that TT methanolic extract may act indirectly in increasing testosterone production and improve sexual performance and semen quality parameters through its antioxidant action, protecting the tissues responsible for the production of the hormone (Shalaby & Hammouda, 2014).

Other studies, however, cast doubt on this property of TT over testosterone. The influence of herbal medicine on erectile dysfunction and the impact on serum androgen levels were tested in 30 healthy and voluntary patients, divided into two groups: experimental (800 mg TT per day, two doses) or placebo. Both groups showed improvement in sexual life satisfaction, but without significant differences between them. The testosterone levels did not change, which allowed the authors to establish that TT is not efficient in the treatment of erectile dysfunction and that the improvement observed in the treatment is due to the placebo effect (Santos Jr et al., 2014).

In another procedure, the protective effect of TT on the spermatogenesis of rats submitted to metronidazole application was evaluated. The application of this drug caused a decrease in testis weight, spermatogenesis, antioxidant enzyme activity, testicular function and increased lipid peroxidation. Although the lower dosage (100 mg/kg/day) showed a partial recovery of the analyzed aspects and the higher dosage (200 mg/kg/day) promoted total recovery, similar to the control group, none of the treatments were able to alter levels of testosterone. The researchers therefore argue that TT is able to reduce oxidative stress, probably because of the flavonoids that act in the stabilization of free radicals, interrupting the chain reaction of oxidation, and not due to the steroidal saponins (Kumari & Singh, 2015).

Souza and colleagues analyzed the influence of TT on the sexual desire disorder of postmenopausal women. The scores in the questionnaires increased, indicating improvement in the quality of the sexual life of the patients. However, the same was observed both in the experimental group and in the placebo group. The authors suggest that there is an increase in

free and bioavailable testosterone. Nevertheless, the variations are minimal and very similar to that observed in the placebo group, which makes the conclusion in favor of the TT questionable (de Souza, Vale, & Geber, 2016). Table 1 summarizes other studies consulted that address the effects of TT on the levels of some target hormones.

<Insert table 1>

#### *Behavioral analyzes and non-hormonal effects*

According to behavioral analyzes, both in humans and in experimental models, there is great agreement about the ability of TT to perform some function in libido and erection. In 2015, Campanelli et al. reported a case of a patient with priapism who maintained an erection for about 72 hours after TT consumption, reinforcing its relationship with sexual performance. The patient did not use other drugs and had never been treated with a 5-phosphodiesterase inhibitor, one of the main treatments for sexual dysfunction currently available. In this case, the patient presented sagging glans and spongy body, with evident tumescence in the corpora cavernosa (CC) (Campanelli, de Thomasis, & Tenaglia, 2015). Several studies show results of improvement in the satisfaction of men and women submitted to treatments of sexual dysfunctions with TT (supplementary table 5).

The administration of TT in 60 women who declared themselves to be sexually unfit, despite being still in the fertile years, led to increased sexual interest based on increased libido (Akhtari et al., 2014). Another study on the effect of TT on the sexual function, conducted with the application of two standardized questionnaires, allowed to conclude that, after 90 days, the administration of a daily dose of 750 mg (250 mg three times a day) is effective in the treatment of postmenopausal women. The treatment improved sexual interest, arousal and comfort in the questionnaire developed specifically for Brazilian women, and also indicated improvement in lubrication, orgasm and sensations in the internationally standardized questionnaire (Postigo et al., 2016). In this study, about one-third of the women in the placebo group also reported improvement in some indicators, reinforcing the psychological factor linked to satisfaction with sexual life. Similarly, other studies have shown positive results for the improvement of sexual satisfaction and performance of men (Adimoelja & Adaikan, 1997; Roaiah et al., 2016a). There are also cases in which the administration of TT combined with other compounds in herbal preparations also presented promising results. However, these studies do not allow to know the actual interference caused by the herbal remedy itself (Sansalone et al., 2014 and 2016).

Similarly, behavioral studies using animals show that TT is able to increase libido and mating frequency, shorten the interval between attempts and recovery time after ejaculation (Singh, Nair, & Gupta, 2012; Gauthaman, Ganesan, & Prasad, 2003; Frydrychová et al., 2011; Gauthaman, Adaikan, & Prasad, 2002; Sahin et al., 2016). These findings reinforce TT's ability to influence libido, serving as a stimulant and reaffirming the herbal's ability to improve sexual performance.

In these cases, the major controversy lies in the means by which the herbal remedy would actually act. If the hormonal function was not clear, how could TT interfere positively with sexuality? Animal studies have shed light on a new possibility that has gained prominence in recent research: the role of TT in the metabolism of NO, which can be independent of the concentration of androgens. At the moment of erection, vasodilation allows greater irrigation of the CC, ensuring penile turgidity. It is known that NO is a vasodilator and that its release occurs through the action of the enzyme NOS, present in endothelial cells and parasympathetic nerves. The NO diffuses into the smooth muscle cells of the CC, activating the enzyme guanylate cyclase, which converts guanosine triphosphate (GTP) to cyclic guanosine monophosphate (cGMP), whose increase in concentration causes relaxation of the arteries and increased blood influx in the CC (Mackay, 2004).

A series of animal experiments showed that TT is able to stimulate NOS activity, increasing NO release and, consequently, facilitating relaxation of muscle tissue in the CC and increasing intracavernous pressure (ICP) (supplementary table 6). Gauthaman and colleagues evaluated the effect of TT on ICP in normal and castrated rats. Castration reduced the body and prostate weight, as well as ICP, which was reversed with the introduction of testosterone alone or TT alone (Gauthaman, Adaikan, & Prasad, 2002). In another study, the researchers tested three different doses of TT and determined that it improved behavioral parameters and increased ICP. The team also noted that the response occurs at the lowest dosage and that increasing dosage does not imply a greater response. Although they did not measure testosterone levels, the authors attributed the observed results to the increase in levels of this hormone, which would cause an increase in NO release and, consequently, an improvement in erection (Gauthaman, Ganesan, & Prasad, 2003).

Adaikan and coworkers isolated strips of the CC tissue from rabbits that received different doses of TT orally. Analysis of the strips revealed that, alone, TT had no discernible effects on tissue. However, after undergoing pre-contraction in noradrenaline, the strips were submitted to three mechanisms of relaxation: stimulation by electric field, acetylcholine and nitroglycerin. In these three situations, the strains from rabbits that received the TT had the

relaxation facilitated in relation to the control, and in a dose-dependent manner. Thus, it is concluded that TT has pro-erectile activity probably by stimulating the release of NO by the endothelium and nitrergic nerve endings, facilitating relaxation of the arteries (Adaikan et al., 2000).

In a similar experiment, researchers sought to investigate the effect of TT and its mechanism of action on rabbit CC relaxation *in vitro*. After prior phenylephrine-induced contraction of tissue, the introduction of TT promoted the increase of ICP in a dose-dependent manner, increasing relaxation of smooth muscle tissue cells. This response was abrogated when the endothelium was removed from the tissue or when the material was treated with L-arginine methyl ester (L-NAME), a NOS inhibitor. The increase in ICP was also observed *in vivo*. The results allowed to conclude that the TT interferes in the pathway of NO release by endothelial cells and nerve endings. However, contrary to what was expected, it was not observed the increase of cGMP, but of cAMP. Thus, although the NOS/NO mechanism is involved, it can use metabolic pathways independent of cGMP (Do et al., 2013). Very similar responses had been reported by Kam et al. (2012) in a similar experiment, indicating the importance of endothelium as a site of action for TT via NOS, and the involvement of cAMP signaling (Kam et al., 2012).

Although not focusing on reproductive biology, an experiment that tested the antihypertensive and vasodilatory capacity of TT in hypertensive rats corroborates these findings. In the study, both the aqueous and ethanolic extracts of TT showed promising results, the first being the most effective in fighting hypertension. The results were partially compromised *in vitro* by adding L-NAME or potassium chloride (KCl), and completely abolished by adding L-NAME + KCl (together). These results reinforce the antihypertensive and vasodilatory capacity of TT, apparently by facilitating the relaxation of smooth muscle cells, possibly involving NO release and membrane hyperpolarization (Phillips, Mathew, & Oriowo, 2006).

Another aspect to consider when we question the action of TT in reproductive biology is the antioxidant property attributed to the plant. If this ability is confirmed, we can attribute a protective role of the herbal remedy to the reproductive organs, which may reflect the improvement of the production of sex hormones (and not simply their indiscriminate increase), the improvement of sexual functions and the quality parameters of the reproductive mechanism system as a whole (supplementary tables 7 and 8).

The analysis of the protective effect of TT on testicular damage caused by cadmium *in vitro* and *in vivo* using rats showed that, although not as efficient as  $\alpha$ -tocopherol, the herbal

medicine has some antioxidant capacity and has helped to reduce damage, avoiding inhibition of antioxidant enzymes and lipid peroxidation (Rajendar et al., 2011). Khaleghi and colleagues added TT directly to human sperm *in vitro* and found that at doses of 40 µg/ml and 50 µg/ml, it increased motility, number of active sperm, activity time and viability. No effect was observed on DNA fragmentation. The authors suggest that trace elements present in the plant, such as calcium and zinc, may act in the inactivation of enzymes, in the stabilization of the nuclear chromatin and in the protection against free radicals, preserving the spermatozoa (Khaleghi et al., 2016).

In another study that compared three different herbal preparations and their influence on sexual functions, serum biochemical parameters, oxidative stress, and levels of nuclear factor kappa B (NF-κB), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (HO-1) in the reproductive tissues of rats, the researchers determined that TT showed the highest efficacy in sexual behavior and antioxidant properties. The authors also suggest that TT improves sexual function by activating the Nrf2/HO-1 pathway, which works to protect tissues against oxidation, and by inhibiting NF-κB levels, involved in the cellular response to stress (Sahin et al., 2016). Other publications that have also analyzed the antioxidant potential of TT have already been addressed in this paper and confirm the protective action of TT by elevating the labeling of antioxidant enzymes, increasing the localization of markers of testicular function, reducing lipid peroxidation, improving quality parameters or reducing degenerative effects of toxic agents administered to the experimental models (Sharma, Huq, & Singh, 2013; Shalaby & Hammouda, 2014; Kumari & Singh, 2015). Table 2 summarize other studies consulted on the effect of TT on sexual behavior, erectile functions, testes function and semen quality parameters.

<Insert table 2>

Some experiments were conducted with non-mammalian animals (supplementary table 9). Two intriguing experiments with TT added to the water of fish of the genus *Poecilia* resulted in a greater masculinization of the offspring, higher fish growth rate and histological alterations of the gonads, which started to present all phases of spermatogenesis, indicating an increase in sperm quality (Çek, Turan, & Atik, 2007; Kavitha, Ramesh, & Subramanian, 2012). TT also showed positive effects on some characteristics of the reproductive capacity of Guinea fowl, increasing laying events, eggs and yolk mass, shell thickness and weight, left testicle mass

and fertility of eggs (Nikolova et al., 2010). Table 3 shows some other experiments that indicate positive results for the effects of TT on the reproductive biology of females.

<Insert table 3>

## **Discussion**

As exposed so far, the controversy about the hormonal effects classically proposed for the action of the herbal remedy *Tribulus terrestris* is set. The first scientific data in this sense came from a pharmaceutical group in Bulgaria and attested that the plant was responsible for increasing libido, raising testosterone in the blood, improving spermatogenesis and sexual function (Pokrywka et al., 2014). However, there are not yet sufficient scientific evidence to support this statement. And on that, there is much to consider.

Several authors believe that a possible explanation for the range of controversial results on the action of TT is that there is no standardization of the experiments performed with the plant. Each of the carried-out researches has different experimental models, at different ages, experimental and health conditions, using different dosages and application forms, different times of treatment and formulations, ranging from pure and raw TT, to that processed by pharmaceutical industries and or combined (sometimes even contaminated) with other components, often with recognized androgenic power, which would invalidate the action of the TT itself. Different types of hormones are also analyzed, which makes comparative analysis difficult: total or free, serum or excreted in the urine, etc. In addition, it is proven that there are some differences in composition between plants harvested in different geographic regions and products obtained from different extraction forms, and in some cases the extract may not present protodioscin, initially crowned as the active molecule of the plant (Kostova & Dinchev, 2005; Dinchev et al., 2008; Ivanova et al., 2011; Chhatre et al., 2014; Qureshi, Naughton, & Petroczi, 2014; Neychev & Mitev, 2016).

In many studies, the discussion of the results found is based on traditional statements, i.e. explanations based on tradition, religion or culture are used as the cause or consequence of the results found. It is not uncommon to find studies that affirm the androgenic potential of TT without even performing hormonal dosages in experimental groups, supported by previous records, often without clear references. There are cases where there is a lack of information on the instruments used in the evaluations. There are records in the literature of works that resorts to usual nomenclatures and procedures in traditional medicine, that are based on dogmatic affirmations regarding the use of the herb, presenting then as scientific issues.

There are studies that are endorsed or stimulated by drug companies that give the drug to the experiments. There are experiments that, despite testing placebos and noticing similar results to experimental groups, conclude the study by stating the supposed effect of treatment. Thus, it is difficult to assert with confidence the impartiality of the studies and the total absence of conflicts of interest.

Despite all this controversy surrounding the mechanism by which the herbal remedy acts on hormone metabolism, there is consistent evidence for TT interference in other aspects of reproductive biology that merit attention, and may become the focus of future studies with the plant. Therefore, it seems plausible to believe that it has some influence on reproductive biology. This is because, although insufficient evidence has been obtained to prove some pharmacological propositions, most of the studies about this herbal medicine show positive results on reproductive aspects, such as improvement in sexual performance and satisfaction, improvement of male and female gametogenesis, and reduction of damage caused by toxic agents to the reproductive tissues.

Consideration should be given to the possibility that the effects of TT may be the result of combined mechanisms rather than a single mechanism alone. Thus, the prominence given to protodioscin may be inadequate, since many other molecules, including other steroidal saponins, have been described (Xu et al., 2001; Kostova et al., 2002; Sun et al., 2002; Huang et al., 2003; Lv et al., 2008; Xu et al., 2008; Su et al., 2009; Xu et al., 2009; Liu et al., 2010; Kozlova, Perederiaev, & Ramenskaia, 2011; Chen et al., 2012). Likewise, we should consider the influence of several factors on the quality of sexual life, such as stress, anxiety, social pressure, use of substances such as alcohol, smoking and other drugs, depression etc. The positive results achieved by placebo groups, although not as expressive as the experimental groups, illustrate the psychological effect that patients present in believing that they are trying to solve problems in sexual health, that can have multifactorial origins and not be exclusively linked to sex hormones levels. Wang and colleagues, for example, have shown that TT is able to reduce markers and hormones related to stress and depression, whose alteration was induced by mild chronic stress in rats. This possible antidepressant action probably acts on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and may influence sexual disposition and performance (Wang et al., 2013).

It should also be emphasized the importance of the conscious use of natural substances, which can pose risks as much as synthetic substances, especially in cases where the performance of the compounds involved is not clear, such as TT (Qureshi, Naughton, & Petroczi, 2014). The genus *Tribulus* is among those considered of low risk, however, data on

its action, efficacy and safety are still few and emergent (West & Krychman, 2015). There are reports of cases in which TT consumption has caused reactions that are very different from those expected, such as the case of gynecomastia discussed in this paper (Jameel et al., 2004) - TT is used to avoid estrogenization by athletes - or the case of the young man who presented severe hyperbilirubinemia followed by acute renal failure and bile traces in the renal tubules (Ryan et al., 2015) - TT is used as a diuretic and in the prevention of kidney problems. Power and Setzer showed that five compounds present in TT were able to interact *in vitro* with estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . This finding opens the possibility that these compounds can act as endocrine disrupters, provoking adverse effects when they bind to these receptors, inactivating them or triggering responses even in the absence of hormones, and may even act as growth promoters of estrogen-dependent tumors (Powers & Setzer, 2015).

Finally, the role of TT in reproductive biology is still a field to be explored, so that its effects, mechanisms, safety against use and efficacy in the treatment of sexual dysfunctions remain intriguing. The influence of plant use on sex hormone levels is not yet clear because of the conflicting data in this regard, especially with regard to TT influence on DHT, about which we have little information. Nor are the mechanisms by which sex hormones respond to TT. The true role of protodioscin in these responses is not yet known. Lastly, it is important to pay more attention to the indiscriminate use of natural substances, as there is a growing demand for this type of treatment, which is exacerbated by the diffusion of unreliable information on the Internet, the main means of communication of actuality.

## **Conclusion**

Although widely reported, TT's ability to influence sex hormone levels does not find a strong foundation in the literature. However, effective responses obtained from the use of the phytotherapeutic in reproductive biology are numerous, which guarantees the research in this area a promising future. New research that tries to explain how these answers are possible will be of great value to offer subsidies that assure the effectiveness of the herbal medicine. Important lines of research in this regard include: the erection mechanism involving nitric oxide metabolism and the participation of cAMP and cGMP in these mechanisms; the antioxidant potential of TT in reproductive tissues and the consequence of this effect on the production of sex hormones; the safety of the use of TT, in view of its potential capacity to act as an endocrine disrupter and interfere with hormonal responses that influence reproductive biology; the possibility of TT presenting local effect, interfering in the functioning of specific structures, but not presenting a systemic effect, such as the elevation of hormones in the blood; and the specific

role of protodioscin, with studies that prove the effect of the molecule, taken as the active principle of TT, alone.

**Acknowledgements:**

Authors are thankful to the illustrator Raduan Alexandre Soleman for the help with the figure charts.

**Funding:**

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [Proc. Nr. 2014/26660-0]; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [Proc. Nr. 305840/2015-0]; and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (Fellowship to DALIS).

**Disclaimers:**

The views expressed in this article are the authors own and not an official position of the institution or funder. The manuscript has been read and approved by all the authors.

**Conflict of interests:**

There are no conflicts of interests.

**References**

- Abadjieva D, Kistanova E. *Tribulus terrestris* Alters the Expression of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Rabbit Ovaries of Mothers and F1 Female Offspring. PLoS One. 2016;11(2):1–17. doi:10.1371/journal.pone.0150400
- Adaay MH, Mosa AA. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Tribulus terrestris* on some reproductive parameters in female mice. J. Mater. Environ. Sci. 2012;3(6):1153–1162.
- Adaikan PG, Gauthaman K, Prasad RNV, Ng SC. Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* extract on the rabbit corpus cavernosum. Ann. Acad. Med. Singapore. 2000;29:22–26.
- Adaikan PG, Gauthaman K, Prasad RNV. History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*. Aging Male. 2001;4:163–169.
- Adimoelja A, Adaikan PG. Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L improves the

male sexual functions, probably via DHEA. *Int. J. Impot. Res.* 1997;9(1):64.

Adimoelja A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. *Int. J. Androl.* 2000;23(2):82–84.

Akhtari E, Raisi F, Keshavarz M, Hosseini H, Sohrabvand F, Bioos S, et al. *Tribulus terrestris* for treatment of sexual dysfunction in women: randomized double-blind placebo - controlled study. *DARU J. Pharm. Sci.* 2014;22(40):1–7. doi:10.1186/2008-2231-22-40

Amin A, Lotfy M, Shafiullah M, Adeghate E. The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:391–401. doi:10.1196/annals.1372.005

Androsten®. Package insert. Herbarium Laboratório Botânico. 2013.

Antonio J, Uelmen J, Rodriguez R, Earnest C. The effects of *Tribulus terrestris* on body composition and exercise performance in resistance-trained males. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2000;10:208–215.

Bahmani M, Baharvand-ahmadi B, Tajeddini P, Rafieian-kopaei M, Naghdi N. Identification of medicinal plants for the treatment of kidney and urinary stones. *J. Ren. Inj. Prev.* 2016;5(3):129–133. doi:10.15171/jrip.2016.27

Bashir A, Tahir M, Samee W, Munir B. Effects of *Tribulus terrestris* on testicular development of immature albino rats. *Biomedica.* 2009;25(5):63–68.

Bhatia H, Sharma YP, Manhas RK, Kumar K. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India. *J. Ethnopharmacol.* 2014;151:1005–1018. doi:10.1016/j.jep.2013.12.017

Brown G, Vukovich M, Reifenrath T, Uhl N, Parsons K, Sharp R, et al. Effects of anabolic precursors on serum testosterone concentrations and adaptations to resistance training in young men. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2000;10(3):340–359.

Brown GA, Vukovich MD, Martini ER, Kohut ML, Franke WD, Jackson DA, et al. Effects of androstenedione-herbal supplementation on serum sex hormone concentrations in 30-59-year-old men. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2001a;71:293–301. doi:10.1024/0300-9831.71.5.293

Brown GA, Vukovich MD, Martini ER, Kohut ML, Franke WD, Jackson DA, et al. Endocrine and lipid responses to chronic androstenediol-herbal supplementation in 30 to 58-year-old men. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001b;20(5):520–528.

- Campanelli M, Thomasis R, Tenaglia R. Priapism caused by *Tribulus terrestris*. *Int. J. Impot. Res.* 2015;28:39–40. doi:10.1038/ijir.2015.30
- Çek Ş, Turan F, Atik E. The effects of Gokshura, *Tribulus terrestris* on sex reversal of Guppy, *Poecilia reticulata*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2007;10(5):718–725.
- Chen G, Liu T, Lu X, Wang H, Hua H, Pei Y. New steroidal glycosides from *Tribulus terrestris* L. *J Asian Nat Prod Res.* 2012;14(8):780–784. doi:10.1080/10286020.2012.694871
- Chhatre S, Nesari T, Somani G, Kanchan D, Sathaye S. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Pharmacogn Rev.* 2014;8(15):45–51. doi:10.4103/0973-7847.125530
- Chu S, Qu W, Pang X, Sun B, Huang X. Effect of saponin from *Tribulus terrestris* on hyperlipidemia. *Zhong Yao Cai.* 2003;26(5):341–344.
- Dehghan A, Esfandiari A, Bigdeli SM. Alternative treatment of ovarian cysts with *Tribulus terrestris* extract: a rat model. *Reprod. Domest. Anim.* 2012;47(1):e12–e15. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01877.x
- Dinchev D, Janda B, Evstatieva L, Oleszek W, Aslani MR, Kostova I. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry.* 2008;69:176–186. doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.003
- Do J, Choi S, Choi J, Hyun JS. Effects and mechanism of action of a *Tribulus terrestris* extract on penile erection. *Korean J. Urol.* 2013;54:183–188. doi:10.4111/kju.2013.54.3.183
- Esfandiari A, Dehghan A, Sharifi S, Najafi B, Vesali E. Effect of *Tribulus terrestris* extract on ovarian activity in immature wistar rat: a histological evaluation. *J. Anim. Vet. Adv.* 2011;10(7):883–886.
- Frydrychová S, Opletal L, Macáková K, Lustyková A, Rozkot M, Lipenský J. Effects of herbal preparation on libido and semen quality in boars. *Reprod. Domest. Anim.* 2011;46:573–578. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01703.x
- Gama CRB, Lasmar R, Gama GF, Abreu CS, Nunes CP, Geller M, et al. Clinical assessment of *Tribulus terrestris* extract in the treatment of female sexual dysfunction. *Clin. Med. Insights Women's Heal.* 2014;7:45–50. doi:10.4137/CMWh.s17853
- Gauthaman K, Adaikan PG, Prasad RNV. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sci.* 2002;71:1385–1396. doi:10.1016/S0024-

3205(02)01858-1

Gauthaman K, Adaikan PG. Effect of *Tribulus terrestris* on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity and androgen receptors in rat brain. *J. Ethnopharmacol.* 2005;96:127–132. doi:10.1016/j.jep.2004.08.030

Gauthaman K, Ganesan AP, Prasad RNV. Sexual effects of Puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (protodioscin): an evaluation using a rat model. *J. Altern. Complement. Med.* 2003;9(2):257–265. doi:10.1089/107628003322490706

Gauthaman K, Ganesan AP. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction - an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine.* 2008;15:44–54. doi:10.1016/j.phymed.2007.11.011

Ho CCK, Tan HM. Rise of herbal and traditional medicine in erectile dysfunction management. *Curr. Urol. Rep.* 2011;12:470–478. doi:10.1007/s11934-011-0217-x

Huang J, Tan C, Jiang S, Zhu D. Terrestrinins A and B, two new steroid saponins from *Tribulus terrestris*. *J Asian Nat Prod Res.* 2003;5(4):285–290.

Ismail SB, Bakar MB, Hussain NHN, Norhayati M, Sulaiman SA, Jaafar H, et al. Comparison on the effects and safety of Tualang honey and Tribestan in sperm parameters, erectile function, and hormonal profiles among oligospermic males. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2014;1–10. doi:10.1155/2014/126138

Ivanova A, Lazarova I, Mechkarova P, Semerdjieva I, Evstatieva L. Intraspecific variability of biologically active compounds of different populations of *Tribulus terrestris* in Thracian floristic region. *Biotechnol. Equip.* 2011;25(2):2357–2361. doi:10.5504/BBEQ.2011.0041

Jameel JKA, Kneeshaw PJ, Rao VSR, Drew PJ. Gynaecomastia and the plant product *Tribulus terrestris*. *The Breast.* 2004;13:428–430. doi:10.1016/j.breast.2003.10.013

Kam SC, Do JM, Choi JH, Jeon BT, Roh GS, Hyun JS. In vivo and in vitro animal investigation of the effect of a mixture of herbal extracts from *Tribulus terrestris* and *Cornus officinalis* on penile erection. *J Sex Med.* 2012;9:2544–2551. doi:10.1111/j.1743-6109.2012.02889.x

Karimi Jashni H, Malekzadeh Shiravani S, Hoshmand F. The effect of the *Tribulus terrestris* extract on spermatogenesis in the rat. *J. Jahrom Univ. Med. Sci.* 2012;9(4):7–11.

- Kavitha P, Ramesh R, Subramanian P. Histopathological changes in *Poecilia latipinna* male gonad due to *Tribulus terrestris* administration. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 2012;48:306–312. doi:10.1007/s11626-012-9517-9
- Kavitha P, Subramanian P. Influence of *Tribulus terrestris* on testicular enzyme in fresh water ornamental fish *Poecilia latipinna*. *Fish Physiol. Biochem.* 2011;37:801–807. doi:10.1007/s10695-011-9478-z
- Khaleghi S, Bakhtiari M, Asadmobini A, Esmaeili F. *Tribulus terrestris* extract improves human sperm parameters in vitro. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* 2016;1–6. doi:10.1177/2156587216668110
- Kistanova E, Zlatev H, Karcheva V, Kolev A. Effect of plant *Tribulus terrestris* extract on reproductive performances of rams. *Biotechnol. Anim. Husband.* 2005;21(1-2):55–63.
- Kostova I, Dinchev D, Rentsch G, Dimitrov V, Ivanova A. Two new sulfated furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Z Naturforsch C.* 2002;57(1-2):33–38.
- Kostova I, Dinchev D. Saponins in *Tribulus terrestris* - chemistry and bioactivity. *Phytochem. Rev.* 2005;4:111–137. doi:10.1007/s11101-005-2833-x
- Kozlova O, Perederiaev O, Ramenskaia G. Determination by high performance chromatography, steroid saponins in a biologically active food supplements containing the extract of *Tribulus terrestris*. *Vopr Pitan.* 2011;80(6):67–71.
- Kumari M, Singh P. *Tribulus terrestris* ameliorates metronidazole--induced spermatogenic inhibition and testicular oxidative stress in the laboratory mouse. *Indian J Pharmacol.* 2015;47(3):304–310. doi:10.4103/0253-7613.157129
- Liu T, Lu X, Wu B, Chen G, Hua H, Pei Y. Two new steroidal saponins from *Tribulus terrestris* L. *J Asian Nat Prod Res.* 2010;12(1):30–35. doi:10.1080/10286020903405449
- Lv A, Zhang N, Sun M, Huang Y, Sun Y, Ma H, et al. One new cinnamic imide derivative from the fruits of *Tribulus terrestris*. *Nat Prod Res.* 2008;22(11):1013–1016. doi:10.1080/14786410701654867
- MacKay D. Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence. *Altern. Med. Rev.* 2004;9(1):4–16.
- Malviya N, Jain S, Gupta VB, Vyas S. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management

of male sexual dysfunction - a review. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 2011;68(1):3–8.

Martino-Andrade AJ, Morais RN, Spencoski KM, Rossi SC, Vechi MF, Golin M, et al. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* 2010;127:165–170. doi:10.1016/j.jep.2009.09.031

Mason MA, Giza M, Clayton L, Lonning J, Wilkerson RD. Use of nutritional supplements by high school football and volleyball players. *Iowa Orthop. J.* 2001;21:43–48.

Mathur M, Sundaramoorthy S. Ethnopharmacological studies of *Tribulus terrestris* (Linn). in relation to its aphrodisiac properties. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 2013;10(1):83–94. doi:10.4314/ajtcam.v10i1.12

Moghaddam MHG, Khalili M, Maleki M, Abadi MEA. The effect of oral feeding of *Tribulus terrestris* L. on sex hormone and gonadotropin levels in addicted male rats. *Int. J. Fertil. Steril.* 2013;7(1):57–62.

Mohd J, Akhtar AJ, Abuzer A, Javed A, Ennus AMT. Pharmacological scientific evidence for the promise of *Tribulus terrestris*. *Int. Res. J. Pharm.* 2012;3(5):403–406.

Morvin Yabesh JE, Prabhu S, Vijayakumar S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India, *J. Ethnopharmacol.* 2014;154:774–789. doi:10.1016/j.jep.2014.05.004

Nahata A, Dixit VK. Evaluation of 5 $\alpha$ -reductase inhibitory activity of certain herbs useful as antiandrogens. *Andrologia.* 2014;46:592–601. doi:10.1111/and.12115

Neychev V, Mitev V. Pro-sexual and androgen enhancing effects of *Tribulus terrestris* L.: fact or fiction. *J. Ethnopharmacol.* 2016;179:345–355. doi:10.1016/j.jep.2015.12.055

Neychev VK, Mitev VI. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. *J. Ethnopharmacol.* 2005;101:319–323. doi:10.1016/j.jep.2005.05.017

Nikolova M, Grigorova S, Abadjieva D, Penkov D. Investigation of the effect of *Tribulus terrestris* extract on some characteristics of the reproductive capacity of Guinea fowl. *Biotechnol. Anim. Husb.* 2010;26(3-4):259–266. doi:10.2298/BAH1004259N

Osborn A, Goss RJM, Field RA. The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 2011;28:1261–1268. doi:10.1039/c1np00015b

- Phillips OA, Mathew KT, Oriowo MA. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats, *J. Ethnopharmacol.* 2006;104:351–355. doi:10.1016/j.jep.2005.09.027
- Pokrywka A, Obmiński Z, Malczewska-Lenczowska J, Fijałek Z, Turek-Lepa E, Grucza R. Insights into supplements with *Tribulus terrestris* used by Athletes. *J. Hum. Kinet.* 2014;41(II):99–105. doi:10.2478/hukin-2014-0037
- Postigo S, Lima SMRR, Yamada SS, Reis BF, Silva GMD, Aoki T. Assessment of the effects of *Tribulus terrestris* on sexual function of menopausal women. *Rev Bras Ginecol Obs.* 2016;38:140–146. doi:10.1055/s-0036-1571472
- Powers CN, Setzer WN. A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *In Silico Pharmacol.* 2015;3(4):1–63. doi:10.1186/s40203-015-0008-z
- Qureshi A, Naughton DP, Petroczi A. A Systematic review on the herbal extract *Tribulus terrestris* and the roots of its putative aphrodisiac and performance enhancing effect. *J. Diet. Suppl.* 2014;11(1):64–79. doi:10.3109/19390211.2014.887602
- Rajendar B, Bharavi K, Rao GS, Kishore PVS, Ravi Kumar P, Satish Kumar CSV, et al. Protective effect of an aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* Linn on cadmium-induced testicular damage. *Indian J Pharmacol.* 2011;43(5):568–573. doi:10.4103/0253-7613.84974
- Roaiah MF, El Khayat YI, Din SFG, El Salam MAA. Pilot study on the effect of botanical medicine (*Tribulus terrestris*) on serum testosterone level and erectile function in aging males with partial androgen deficiency (PADAM). *J. Sex Marital Ther.* 2016a;42(4):297–301. doi:10.1080/0092623X.2015.1033579
- Roaiah MF, Elkhayat YI, Saleh SFGD, El Salam MAA. Prospective analysis on the effect of botanical medicine (*Tribulus terrestris*) on serum testosterone level and semen parameters in males with unexplained infertility. *J. Diet. Suppl.* 2016b;14:1–7. doi:10.1080/19390211.2016.1188193
- Rogerson S, Riches CJ, Jennings C, Weatherby RP, Meir RA, Marshall-Gradisnik SM. The effect of five weeks of *Tribulus terrestris* supplementation on muscle strength and body composition during preseason training in elite rugby league players. *J. Strength Cond. Res.* 2007;21(2):348–353.

- Ryan M, Lazar I, Nadasdy G, Nadasdy T, Satoskar AA. Acute kidney injury and hyperbilirubinemia in a young male after ingestion of *Tribulus terrestris*. *Clin Nephrol*. 2015;83(3):177–183. doi:10.5414/CN108324
- Sahin K, Orhan C, Akdemir F, Tuzcu M, Gencoglu H, Sahin N, et al. Comparative evaluation of the sexual functions and NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways of some aphrodisiac herbal extracts in male rats. *BMC Complement. Altern. Med*. 2016;16(318):1–11. doi:10.1186/s12906-016-1303-x
- Sahoo HB, Nandy S, Senapati AK, Sarangi SP, Sahoo SK. Aphrodisiac activity of polyherbal formulation in experimental models on male rats. *Pharmacogn. Res*. 2014;6(2):120–126. doi:10.4103/0974-8490.129029
- Salgado RM, Marques-Silva MH, Gonçalves E, Mathias AC, Aguiar JG, Wolff P. Effect of oral administration of *Tribulus terrestris* extract on semen quality and body fat index of infertile men. *Andrologia*. 2017;49(5). doi:10.1111/and.12655
- Samani NB, Jokar A, Soveid M, Heydari M, Mosavat SH. Efficacy of *Tribulus terrestris* extract on the serum glucose and lipids of women with diabetes mellitus. *Iran J Med Sci*. 2016;41(3):5.
- Sandeep PM, Bovee TFH, Sreejith K. Anti-androgenic activity of *Nardostachys jatamansi* DC and *Tribulus terrestris* L. and their beneficial effects on polycystic ovary syndrome–induced rat models. *Metab. Syndr. Relat. Disord*. 2015;13(6):248–254. doi:10.1089/met.2014.0136
- Sansalone S, Leonardi R, Antonini G, Vitarelli A, Vespasiani G, Basic D, et al. Alga *Ecklonia bicyclis*, *Tribulus terrestris*, and Glucosamine Oligosaccharide improve erectile function, sexual quality of life, and ejaculation function in patients with moderate mild-moderate erectile dysfunction: a prospective, randomized, placebo-controlled, single-blinded study. *Biomed Res. Int*. 2014;1–7. doi:10.1155/2014/121396
- Sansalone S, Russo GI, Mondaini N, Cantiello F, Antonini G, Cai T. A combination of tryptophan, *Satureja montana*, *Tribulus terrestris*, *Phyllanthus emblica* extracts is able to improve sexual quality of life in patient with premature ejaculation. *Arch. Ital. Di Urol. E Androl*. 2016;88(3):171–176. doi:10.4081/aiua.2016.3.171
- Santos Jr CA, Reis LO, Destro-Saade R, Luiza-Reis A, Fregonesi A. *Tribulus terrestris* versus placebo in the treatment of erectile dysfunction: a prospective, randomized, double-blind study. *Actas Urológicas Españolas*. 2014;38(4):244–248. doi:10.1016/j.acuroe.2014.03.009

- Saudan C, Baume N, Emery C, Strahm E, Saugy M. Short term impact of *Tribulus terrestris* intake on doping control analysis of endogenous steroids. *Forensic Sci. Int.* 2008;178:e7–e10. doi:10.1016/j.forsciint.2008.01.003
- Shalaby MA, Hammouda AAEK. Assessment of protective and anti-oxidant properties of *Tribulus terrestris* fruits against testicular toxicity in rats. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 2014;3(3):113–118. doi:10.5455/jice.20140627123443
- Sharma P, Huq AU, Singh R. Cypermethrin induced reproductive toxicity in male Wistar rats: protective role of *Tribulus terrestris*. *J. Environ. Biol.* 2013;34:857–862.
- Singh S, Nair V, Gupta YK. Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats. *J Pharmacol Pharmacother.* 2012;3(1):43–47. doi:10.4103/0976-500X.92512
- Souza KZD, Vale FBC, Geber S. Efficacy of *Tribulus terrestris* for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in postmenopausal women: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Menopause J. North Am. Menopause Soc.* 2016;23(11):1252–1256. doi:10.1097/GME.0000000000000766
- Su L, Chen G, Feng SG, Wang W, Li ZF, Chen H, et al. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. *Steroids.* 2009;74:399–403. doi:10.1016/j.steroids.2008.12.008
- Sun W, Gao J, Tu G, Guo Z, Zhang Y. A new steroidal saponin from *Tribulus terrestris* Linn. *Nat Prod Lett.* 2002;16(4):243–247. doi:10.1080/10575630290020541
- Ukani MD, Nanavati DD, Mehta NK. A review on the Ayurvedic herb *Tribulus terrestris* L. *Anc. Sci. Life.* 1997;17(2):144–150.
- Wang Y, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K. Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. *Phytochemistry.* 1996;42(5):1417–1422. doi:10.1016/S0031-9422(97)00043-5
- Wang Z, Zhang D, Hui S, Zhang Y, Hu S. Effect of *Tribulus terrestris* saponins on behavior and neuroendocrine in chronic mild stress depression rats. *J Tradit Chin Med.* 2013;33(2):228–232.
- West E, Krychman M. Natural aphrodisiacs — a review of selected sexual enhancers. *Sex Med Rev.* 2015;3:279–288. doi:10.1002/smrj.62
- Xu T, Xu Y, Liu Y, Xie S, Si Y, Xu D. Two new furostanol saponins from *Tribulus terrestris*

L. *Fitoterapia*. 2009;80:354–357. doi:10.1016/j.fitote.2009.05.00

Xu T, Xu Y, Xie S, Zhao H, Han D, Li Y, et al. Two new furostanol saponins from *Tribulus terrestris* L. *J Asian Nat Prod Res*. 2008;10(5-6):419–423. doi:10.1080/10286020801966575

Xu Y, Xie S, Zhao H, Han D, Xu T, Xu D. Studies on the chemical constituents from *Tribulus terrestris*. *Yao Xue Xue Bao*. 2001;36(10):750–753.

Yin L, Wang Q, Wang X, Song LN. Effects of *Tribulus terrestris* L. saponins on exercise performance in overtraining rats and the underlying mechanisms. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2016;94(11):1193–1201. doi:10.1139/cjpp-2016-0086.

## Legends of the figures

Figure 1: Aerial parts of *Tribulus terrestris*, family Zygophyllaceae. The species, especially the aerial parts, is widely used in traditional medicines as an aphrodisiac. It is commonly found in the Mediterranean, in regions of desert and subtropical climate.

Figure 2: The three main pathways with hormonal effects delegated to the protodioscin molecule, a steroidal saponin present in the extract of the plant *Tribulus terrestris*, considered, for a long time, the main active principle of the herbal remedy. (1) Stimulation of cerebral androgen receptors (AR) and increased release of luteinizing hormone (LH); (2) increased activity of the enzyme  $5\alpha$ -reductase and the reduction of testosterone into dihydrotestosterone (DHT); (3) conversion of the protodioscin molecule to dehydroepiandrosterone (DHEA).

## Figures

Figure 1. Aerial parts of *Tribulus terrestris*. Lopes-Silva DA.

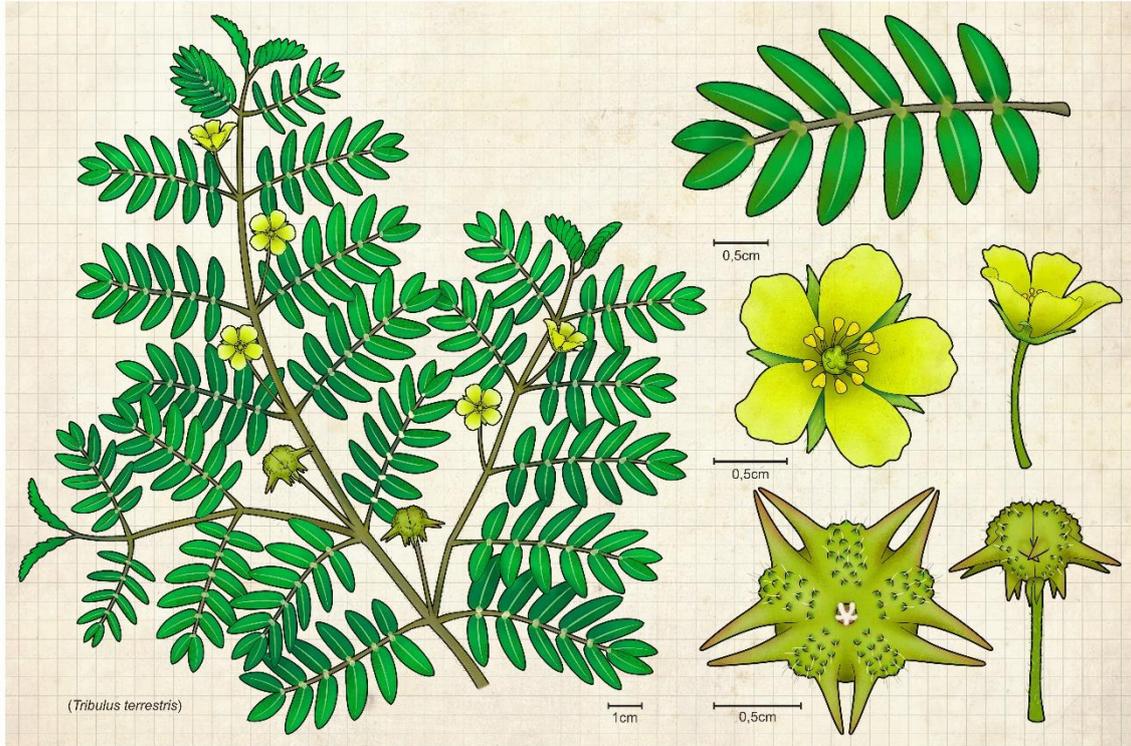
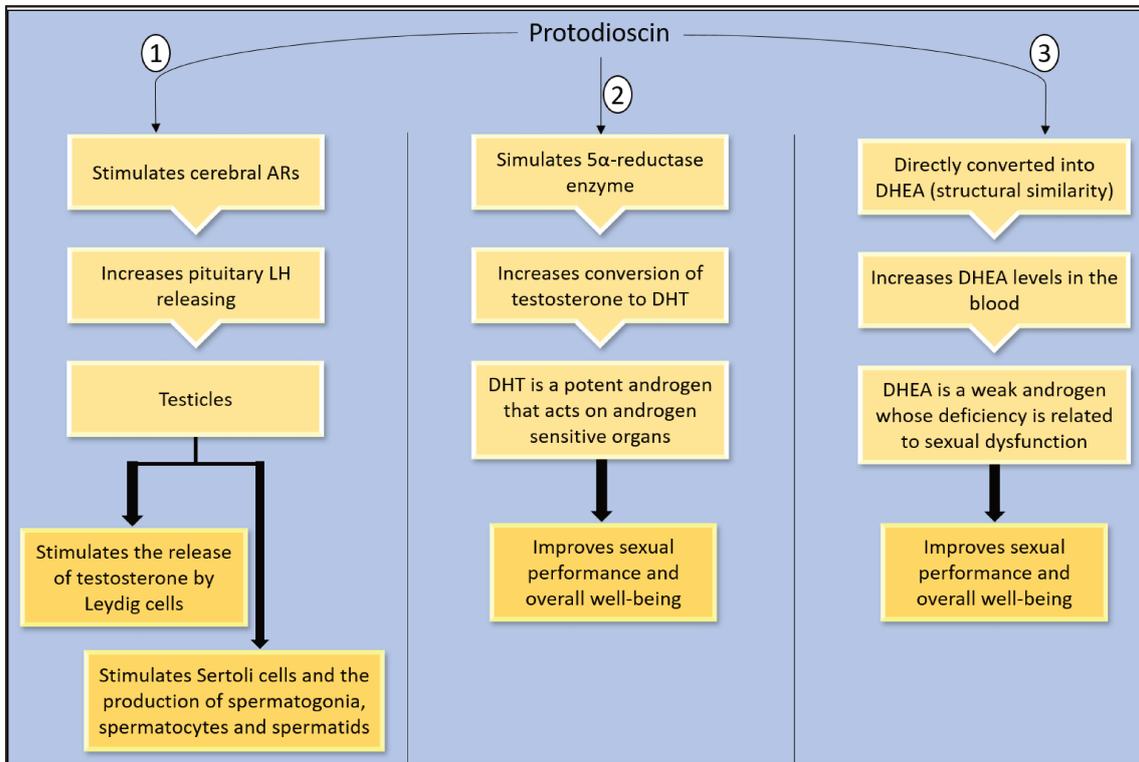


Figure 2. The three main pathways with hormonal effects delegated to protodioscin. Lopes-Silva DA.



## Tables

Table 1: Other experiments with *Tribulus terrestris* (TT) and the effects observed on the levels of some target hormones.

<b>Author</b>	<b>Experimental models and main results</b>
<b>Luteinizing Hormone (LH)</b>	
Brown et al., 2000	Men: no statistically significant changes.
Adaay & Mosa, 2012	Swiss white mice: according to the author, it was found a remarkable increase in LH levels in the two experimental groups compared to the control. However, there is no statistically significant changes.
Sahin et al., 2016	Sprague-Dawley rats: no statistically significant changes.
<b>Dihydrotestosterone (DHT)</b>	
Brown et al., 2001a	Men: DHT levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Brown et al., 2001b	Men: DHT levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
<b>Testosterone</b>	
Brown et al., 2000	Men: no statistically significant changes.
Brown et al., 2001a	Men: no statistically significant changes in total testosterone. Free testosterone levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Brown et al., 2001b	Men: no statistically significant changes in total testosterone. Free testosterone levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Rogerson et al., 2007	Men: no statistically change in testosterone/epitestosterone rate was observed, which indicates that there were no changes in metabolism of these hormones.
Sansalone et al., 2014	Men: no statistically significant changes.
Sahin et al., 2016	Sprague-Dawley rats: testosterone levels were 1.76-fold higher than observed in control. Data were statistically significant.

Table 2: Other experiments with *Tribulus terrestris* (TT) and its effects on sexual behavior, erectile function, semen quality parameters and testes function.

Author	Experimental models and main results
<b>Sexual behavior and erectile function</b>	
Kistanova et al., 2005	Rams: all animals showed a good libido and the influence of age seems to be more determinant than TT supplementation on sexual behavior. It was observed a positive effect of TT in mature rams, reducing the duration of sexual reflexes. Statistical analyzes were not explicit.
Bashir et al., 2009	Albino rats: TT has a complex stimulating effect on germinative and endocrine functions of the testes producing its precocious development and anticipating puberty.
Kam et al., 2012	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats: TT alone or combined with <i>Cornus officinalis</i> showed a concentration-dependent relaxation effect on the CC in an organ bath and an increase in ICP <i>in vivo</i> , which means that TT may improve erectile function. Data are statistically significant.
<b>Testes function and semen quality parameters</b>	
Kistanova et al., 2005	Rams: significant improvement in semen quality by increasing sperm count and concentration, increasing viability, motility, survival rate, and fertility.
Bashir et al., 2009	Albino rats: statistically increased testes weight and seminiferous tubule diameter indicate increased spermatogenesis.
Frydrychová et al., 2011	Boars: treatment caused increase in sperm concentration, abnormal sperm count and concentration of Mg ions, besides volume reduction, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result. Results were statistically significant.
Kavitha & Subramanian, 2011	Fish ( <i>Poecilia latipinna</i> ): increased body and testicular weights and altered levels of enzymes reflect increased testicular activity: ALP and ACP - improvement in spermatogenesis SDH and LDH - germ cell and epithelial maturation G6PDH - improvement in Leydig cell function Data were statistically significant.
Karimi Jashni, Malekzadeh Shiravani, & Hoshmand, 2012	Wistar rats: statistically increased number of primary spermatocytes at a dose of 10 mg/kg could contribute to increased sperm count.
Mathur & Sundaramoorthy, 2013	Mice: reduction of testis and epididymis weight, damage to testicular histoarchitecture and drastic reduction of sperm density reflect damage to spermatogenesis probably caused by androgenic effects of TT, as a result of negative feedback. There is no mention to statistical analyses in the results of the bioassay.

Footnote: ICP - intracavernous pressure; CC - corpora cavernosa; ALP - alkaline phosphatase; ACP - acid phosphatase; SDH - succinate dehydrogenase; LDH - lactic dehydrogenase; G6PDH - glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Table 3: Other experiments with *Tribulus terrestris* (TT) and observed effects on the reproductive biology of females.

<b>Author</b>	<b>Experimental models and main results</b>
Nikolova et al., 2010	Guinea fowl: TT significantly increased egg laying, egg weight and egg yolks, shell weight and thickness, and fertility.
Dehghan, Esfandiari, & Bigdeli., 2012	Wistar rats: TT significantly ameliorated PCOS induced in the experiments, increased the number of corpora lutea and primary and secondary follicles, returning the ovarian activity.
Esfandiari et al., 2011	Wistar rats: treatment significantly increased the number of corpora lutea and the diameter of the theca interna, anticipated puberty and increased the number of secondary follicles in a dose-dependent manner.
Adaay & Mosa, 2012	Swiss albino mice: 2 weeks - the two dosages statistically increased the number of growing follicles, the diameter of mature follicles, height and number of endometrial glands. 4 weeks - significant increase of body mass and reproductive organs, endometrium and glands in both doses. Treatments reduced estradiol levels, but with no statistical difference.
Sandeep et al., 2015	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats: TT significantly attenuated the symptoms of PCOS in a dose-dependent manner, helped to regulate high levels of estradiol and progesterone and increased the number of corpora lutea, normalizing the estrous cycle at the highest dose.
Abadjieva & Kistanova, 2016	New Zealand rabbits: treatment caused ovarian mass gain, increased maternal instinct and offspring survival, increased follicle density. It elevated the expression of GDF-9, which favors fertility. Evidence that TT has epigenetic effects on folliculogenesis. Results are statistically significant.

Footnote: PCOS - polycystic ovary syndrome; GDF-9 - growth differentiation factor 9.

## Supplementary material

Supplementary Table 1. *Tribulus terrestris* and effects observed on levels of luteinizing hormone.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Adimoelja & Adaikan, 1997	Men	Libilov® 3 x 250 mg/day Orally 3 weeks	No statistically significant changes.
Brown et al., 2000	Men	Andro-6® Daily dose: 150 mg DHEA + 300 mg androstenedione + 300 mg indole-3-carbinol + 450 mg saw palmetto + 750 mg TT. Acute administration: one-third of daily dose; supplementation during resistance training: daily dose during weeks 1-2, 4-5, 7-8 Orally 8 weeks	No statistically significant changes.
Jameel et al., 2004	Case report: one man	Brand, dose and treatment time not informed Orally	LH presented under normal levels during TT intake and returned to normal levels after interrupting the use.
Neychev & Mitev, 2005	Men	Dry extract 10 mg and 20 mg/kg Orally 4 weeks	No statistically significant changes.
Saudan et al., 2008	Women	Tribestam® 3 x 500 mg/day Orally 2 consecutive days	No statistically significant changes.
Adaay & Mosa, 2012	Swiss White mice	Aqueous extract 100 mg and 200 mg/kg/day Orally 2 or 4 weeks	According to the author, it was found a remarkable increase in LH levels in the two experimental groups during the two periods of the experiment compared to the control groups. However, there is no statistically significant changes.
Moghaddan et al., 2013	Wistar rats	Plant-mixed pelleted food 6.25% feed proportion Orally 4 weeks	The dependence on morphine caused lower LH levels. TT was able to recover LH concentrations beyond that provided by the control group. Differences were statistically significant.
Sharma, Huq, & Singh, 2013	Wistar rats	Ethanol extract 100 mg/kg/day Orally 28 days	Treatments of $\alpha$ -cypermethrin-intoxicated rats with TT significantly increased serum LH levels when compared with the intoxicated control group. TT alone caused statistically increased LH levels when compared to experimental control.
Sahoo et al., 2014	Swiss albino rats	Prepared Herbal Formulation (TT + six other herbs) 150 mg, 300 mg and 600 mg/kg/day Orally 3 weeks	LH levels increased in a dose-dependent manner, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.

Interruption of supplementary table 1 >

< Continuation of supplementary table 1:

Shalaby & Hammouda, 2014	Sprague-Dawley rats	Methanolic extract of dried fruit 2.5 mg, 5 mg and 10 mg/kg/day Orally 60 days	Pre-treatments of sodium valproate-intoxicated rats with TT significantly increased serum LH levels when compared with the intoxicated control group, in a dose dependent fashion.
Roaiah et al., 2016a	Men	Ethanol, methanol, acetonitrile or hexane extract 3 x 250 mg/day Orally 3 months	No statistically significant changes.
Roaiah et al., 2016b	Men	Ethanol, methanol, acetonitrile or hexane extract 3 x 250 mg/day Orally 3 months	No statistically significant changes.
Sahin et al., 2016	Sprague-Dawley rats	Hydro-methanolic extract of dried fruit 300 mg/kg/day Orally 8 weeks	No statistically significant changes.
Salgado et al., 2016	Men	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 84 days	No statistically significant changes.
Sansalone et al., 2016	Men	EiacuMev® ( <i>Satureya montana</i> + TT + <i>Phyllanthus emblica</i> + Cardamom + L-tryptophan + ascorbic acid + vitamin PP + vitamin B1 + vitamin B6) 300 mg/day Orally 3 months	No statistically significant changes.

Supplementary Table 2. *Tribulus terrestris* and effects observed on levels of dihydrotestosterone.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Brown et al., 2001a	Men	DION® Daily dose: 300 mg androstenedione + 150 mg DHEA + 540 mg saw palmetto + 300 mg indole-3-carbinol + 625 mg chrysin + 750 mg TT, divided in three times a day Orally 28 days	DHT levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Brown et al., 2001b	Men	AND-HB® Daily dose: 300 mg androstenediol + 480 mg saw palmetto + 450 mg indole-3-carbinol + 300 mg chrysin + 1500 mg gamma linolenic acid + 1350 mg TT, divided in three times a day Orally 28 days	DHT levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Gauthaman & Ganesan, 2008	Primates New Zealand white rabbits Sprague-Dawley rats	TT (Sopharma, Bulgaria & Tegushindo, Indonesia) Primates: 7.5 mg, 15 mg and 30 mg/kg, intravenously at the time of the experiment Rabbits: 2.5 mg, 5 mg and 10 mg/kg, orally, 8 weeks Rats: 5 mg/kg, orally, 8 weeks	Primates: DHT presented statistically higher between 15 and 30 minutes after injection in the three dosages. Rabbits: DHT presented statistically higher in doses 5 mg and 10 mg Rats: no statistically significant changes in both normal and castrated groups.
Salgado et al., 2016	Men	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 84 days	Blood serum concentrations of DHT increased significantly between days 0 and 84.

Supplementary Table 3. *Tribulus terrestris* and effects observed on levels of dehydroepiandrosterone.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Adimoelja & Adaikan, 1997	Men	Libilov® 3 x 250 mg/day Orally 3 weeks	TT caused statistically elevated DHEA-S in the blood of diabetic and non-diabetic men.
Neychev & Mitev, 2005	Men	Dry extract 10 mg and 20 mg/kg Orally 4 weeks	According to authors, DHEA is a precursor of androstenedione, which did not change, suggesting that there was no increase in DHEA levels.
Gauthaman & Ganesan, 2008	Primates	TT (Sopharma, Bulgaria & Tegushindo, Indonesia) 7.5 mg, 15 mg and 30 mg/kg, intravenously at the time of the experiment	TT caused elevated DHEA-S in the blood of primates, although the difference was statistically significant only in the lower dose and between 60 and 180 minutes after injection.
Saudan et al., 2008	Women	Tribestam® 3 x 500 mg/day Orally 2 consecutive days	No statistically significant changes.
Martino-Andrade et al., 2010	Wistar rats	Androsten® 11 mg, 42 mg and 110 mg/kg/day Gavage 7 days	No statistically significant changes.
Gama et al., 2014	Women	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 90 days	TT caused statistically elevated DHEA-S in the blood of post-treated women.
Salgado et al., 2016	Men	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 84 days	No statistically significant changes.

Supplementary Table 4. *Tribulus terrestris* and effects observed on testosterone levels.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Brown et al., 2000	Men	Andro-6® Daily dose: 150 mg DHEA + 300 mg androstenedione + 300 mg indole-3-carbinol + 450 mg saw palmetto + 750 mg TT. Acute administration: one-third of daily dose; supplementation during resistance training: daily dose during weeks 1-2, 4-5, 7-8 Orally 8 weeks	No statistically significant changes.
Brown et al., 2001a	Men	DION® Daily dose: 300 mg androstenedione + 150 mg DHEA + 540 mg saw palmetto + 300 mg indole-3-carbinol + 625 mg chrysin + 750 mg TT, divided in three times a day Orally 28 days	No statistically significant changes in total testosterone. Free testosterone levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Brown et al., 2001b	Men	AND-HB® Daily dose: 300 mg androstenediol + 480 mg saw palmetto + 450 mg indole-3-carbinol + 300 mg chrysin + 1500 mg gamma linolenic acid + 1350 mg TT, divided in three times a day Orally 28 days	No statistically significant changes in total testosterone. Free testosterone levels increased after supplementation compared to day 0 within groups of the same age, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Jameel et al., 2004	Case report: one man	Brand, dose and treatment time not informed Orally	Testosterone presented under normal levels during TT intake and returned to normal levels after interrupting the use.
Neychev & Mitev, 2005	Men	Dry extract 10 mg and 20 mg/kg Orally 4 weeks	No statistically significant changes.
Rogerson et al., 2007	Men	TT (Body Science) 450 mg/day Orally 5 weeks	No statistically change in testosterone/epitesterone rate was observed, which indicates that there were no changes in metabolism of these hormones.
Gauthaman & Ganesan, 2008	Primates New Zealand white rabbits Sprague-Dawley rats	TT (Sopharma, Bulgaria & Tegushindo, Indonesia) Primates: 7.5 mg, 15 mg and 30 mg/kg, intravenously at the time of the experiment Rabbits: 2.5 mg, 5 mg and 10 mg/kg, orally, 8 weeks Rats: 5 mg/kg, orally, 8 weeks	Primates: testosterone presented statistically higher between 15 and 30 minutes after injection in the three dosages. Rabbits: No statistically significant changes. Rats: No statistically significant changes in normal rats. However, TT prevented the decrease caused by castration.

Interruption of supplementary table 4&gt;

&lt; Continuation of supplementary table 4:

Saudan et al., 2008	Women	Tribestam® 3 x 500 mg/day Orally 2 consecutive days	No change in urine testosterone metabolite rates indicates that there were no changes in the levels of this hormone.
Martino-Andrade et al., 2010	Wistar rats	Androsten® 11 mg, 42 mg and 110 mg/kg/day Gavage 7 days	No statistically significant changes.
Singh, Nair, & Gupta, 2012	Albino Wistar rats	Lyophilized aqueous extract of the dried fruits 50 mg and 100 mg/kg Orally Acute study: 50 minutes before mating Chronic study: once a day for 14 days	Chronic use significantly increased serum testosterone levels in both doses when compared to control group.
Moghaddan et al., 2013	Wistar rats	Plant-mixed pelleted food 6.25% feed proportion Orally 4 weeks	The dependence on morphine caused lower testosterone levels. TT was not able to recover testosterone concentrations to that provided by the control group.
Sharma, Huq, & Singh, 2013	Wistar rats	Ethanol extract 100 mg/kg/day Orally 28 days	Treatments of <i>a</i> -cypermethrin-intoxicated rats with TT partially recover serum testosterone levels when compared with the intoxicated control group. TT alone caused statistically increased testosterone levels when compared to experimental control.
Gama et al., 2014	Women	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 90 days	Total testosterone levels decreased after treatment, although it was not statistically significant. There was a statistically significant reduction in mean free testosterone post-treatment.
Sahoo et al., 2014	Swiss albino rats	Prepared Herbal Formulation (TT + six other herbs) 150 mg, 300 mg and 600 mg/kg/day Orally 3 weeks	Testosterone levels increased in a dose-dependent manner, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Sansalone et al., 2014	Men	Tradmix TX1000® 2 tablets a day (1 tablet: 300 mg <i>Ecklonia bicyclis</i> + 450 mg TT + 250 mg glucosamine oligosaccharide) Orally 3 months	No statistically significant changes.
Santos Junior et al., 2014	Men	TT dry extract 2 x 400 mg/day Orally, with empty stomach 30 days	No statistically significant changes.
Shalaby & Hammouda, 2014	Sprague-Dawley rats	Methanolic extract of dried fruit 2.5 mg, 5 mg and 10 mg/kg/day Orally 60 days	Pre-treatments of sodium valproate-intoxicated rats with TT significantly increased serum testosterone levels when compared with the intoxicated control group, in a dose dependent fashion.

Interruption of supplementary table 4&gt;

< Continuation of supplementary table 4:

Kumari & Singh, 2015	Swiss mice	Fruit extract 100 mg and 200 mg/kg/day Orally 28 days	No statistically significant changes.
Sandeep, Bovee, & Sreejith, 2015	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats	Methanolic extract 5 mg and 10 mg Intraperitoneal injection 13 days	TT showed antiandrogenic activity <i>in vitro</i> and statistically reduced testosterone levels <i>in vivo</i> .
Roaiah et al., 2016a	Men	Ethanol, methanol, acetonitrile or hexane extract 3 x 250 mg/day Orally 3 months	Total and free testosterone levels increased after supplementation. Data were statistically significant.
Roaiah et al., 2016b	Men	Ethanol, methanol, acetonitrile or hexane extract 3 x 250 mg/day Orally 3 months	No statistically significant changes.
Sahin et al., 2016	Sprague-Dawley rats	Hydro-methanolic extract of dried fruit 300 mg/kg/day Orally 8 weeks	Testosterone levels were 1.76-fold higher than observed in control. Data were statistically significant.
Salgado et al., 2016	Men	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 84 days	No statistically significant changes.
Sansalone et al., 2016	Men	EiacuMev® ( <i>Satureya montana</i> + TT + <i>Phyllanthus emblica</i> + Cardamom + L- tryptophan + ascorbic acid + vitamin PP + vitamin B1 + vitamin B6) 300 mg/day Orally 3 months	No statistically significant changes.
Souza, Vale, & Geber, 2016	Women	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 120 days	No statistically significant changes were observed in total testosterone. Free and bioavailable testosterone levels showed a significant increase in treated group.
Yin et al., 2016	Sprague-Dawley rats	Extract of dried fruits 120 mg/kg Intragastrically 6 weeks	Testosterone level increased 150% when compared to control and 216% when compared to over trained group. Data are statistically significant.

Supplementary Table 5. *Tribulus terrestris* and effects observed on sexual behavior and erectile function.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Adimoelja & Adaikan, 1997	Men	Libilov® 3 x 250 mg/day Orally 3 weeks	Significant increase in the frequency of successful sexual intercourse in 60% of the patients with erectile dysfunction.
Adaikan et al., 2000	New Zealand white rabbits	TT 2.5 mg, 5 mg and 10 mg/kg/day Orally 8 weeks	Animals treated with TT extract presented more easily relaxing CC tissue, which favors erection, in a dose-dependent nature. Data were statistically significant for relaxation by electrical field stimulation.
Gauthaman, Adaikan, & Prasad, 2002	Sprague-Dawley rats	TT (Sopharma) 5 mg/kg/day Orally 8 weeks	Treatment caused increased ICP and improved the analyzed sexual behavior parameters, although TT was not as effective as testosterone cypionate. Results were statistically significant.
Gauthaman, Ganesan, & Prasad, 2003	Sprague-Dawley rats	TT (Sopharma) 2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg/day Orally 8 weeks	Treatment caused increased ICP and improved the analyzed sexual behavior parameters. Changes were already observed at the lowest dose and did not increase at higher doses. Results were statistically significant.
Kistanova et al., 2005	Rams	TT extract (Vemo) 1.5 g per head Orally 40 days	All animals showed a good libido and the influence of age seems to be more determinant than TT supplementation on sexual behavior. It was observed a positive effect of TT in mature rams, reducing the duration of sexual reflexes. Statistical analyzes were not explicit.
Bashir et al., 2009	Albino rats	TT extract 70 mg/kg/day Orally 20 days	TT has a complex stimulating effect on germinative and endocrine functions of the testes producing its precocious development and anticipating puberty.
Frydrychová et al., 2011	Boars	Preparation of Herbal Extracts ( <i>Eurycoma longifolia</i> + TT + <i>Leuzea carthamoides</i> ) 1 mg/kg/day of TT in the mixture Orally 10 weeks	Herbal preparation increased in 20 % the libido in experimental group, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result. Results were statistically significant.
Kam et al., 2012	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats	Ethanol and aqueous extracts of TT and <i>Cornus officinalis</i> 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg and 100 mg/kg/day Orally 4 weeks	TT alone or combined with <i>Cornus officinalis</i> showed a concentration-dependent relaxation effect on the CC in an organ bath and an increase in ICP <i>in vivo</i> , which means that TT may improve erectile function. Data are statistically significant.
Singh, Nair, & Gupta, 2012	Albino Wistar rats	Lyophilized aqueous extract of the dried fruits 50 mg and 100 mg/kg Orally Acute study: 50 minutes before mating Chronic study: once a day for 14 days	Treatment improved sexual behavior in a dose-dependent fashion. The chronic use of TT showed better results when compared with acute study. Results were statistically significant.

Interruption of supplementary table 5&gt;

&lt; Continuation of supplementary table 5:

Do et al., 2013	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats	Ethanol and aqueous extracts 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg and 100 mg/kg/day Orally 4 weeks	TT showed a concentration-dependent relaxation effect on the CC in an organ bath and an increase in ICP <i>in vivo</i> , which means that TT may improve erectile function. Data are statistically significant.
Akhtari et al., 2014	Women	Syrup of ethanolic extract of TT leaves 2 x 7.5 ml of syrup/day (0.7 g/ml) Orally 4 weeks	Patients showed increased scores related to questions about desire, arousal and satisfaction. Treatment improved sexual behavior. Results are statistically significant.
Gama et al., 2014	Women	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 90 days	Treatment increased standardized questionnaires scores, which indicates improvement in sexual function. Results were statistically significant.
Sahoo et al., 2014	Swiss albino rats	Prepared Herbal Formulation (TT + six other herbs) 150 mg, 300 mg and 600 mg/kg/day Orally 3 weeks	The polyherbal formulation showed a significant increase in mating behavior as well as mating performance, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result.
Sansalone et al., 2014	Men	Tradmix TX1000® 2 tablets a day (1 tablet: 300 mg <i>Ecklonia bicyclis</i> + 450 mg TT + 250 mg glucosamine oligosaccharide) Orally 3 months	Therapy increased sexual and ejaculatory functions, improving sexual life quality, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result. Data were statistically significant.
Santos Jr et al., 2014	Men	TT dry extract 2 x 400 mg/day Orally, with empty stomach 30 days	No statistically significant differences were observed in the parameters analyzed for erectile dysfunction between experimental and placebo group.
Campanelli, Thomasis, & Tenaglia, 2015	Case report: one man	Brand not informed 2 capsules a day Orally 15 days	Patient with priapism kept painful erection for about 72 hours after TT intake.
Postigo et al., 2016	Women	TT 3 x 250 mg/day Orally 90 days	Treatment was effective over menopausal women's complaints, improving the domains of sexual desire, vaginal lubrication, and arousal. Results are statistically significant.
Roaiah et al., 2016a	Men	Ethanol, methanol, acetonitrile or hexane extract 3 x 250 mg/day Orally 3 months	Treatment statistically improved erectile function.
Sahin et al., 2016	Sprague-Dawley rats	Hydro-methanolic extract of dried fruit 300 mg/kg/day Orally 8 weeks	Among the herbal extracts analyzed in the study, TT showed the highest effectiveness. Treatment improved the analyzed sexual behavior parameters. Results were statistically significant.

Interruption of supplementary table 5&gt;

< Continuation of supplementary table 5:

Sansalone et al., 2016	Men	EiacuMev® ( <i>Satureya montana</i> + TT + <i>Phyllanthus emblica</i> + Cardamom + L-tryptophan + ascorbic acid + vitamin PP + vitamin B1 + vitamin B6) 300 mg/day Orally 3 months	Patients affected by premature ejaculation may significantly benefit from the therapy, which improved scores in standardized questionnaires indicating improvement of ejaculation control. Although, it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result. Data were statistically significant.
Souza, Vale, & Geber, 2016	Women	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 120 days	Patients statistically improved scores of standardized questionnaires on sexual functions, concluding in favor of TT capacity of treat hypoactive sexual desire disorder in postmenopausal women.

Supplementary Table 6. *Tribulus terrestris* and observed effects on nitric oxide metabolism.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Gauthaman & Adaikan, 2005	Sprague-Dawley rats	TT (Sopharma) 5 mg/kg/day Orally 8 weeks	The 67% increase of NADPH-d activity indicates increased activity of NOS-positive neurons. Results are statistically significant.
Kam et al., 2012	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats	Ethanollic and aqueous extracts of TT and <i>Cornus officinalis</i> 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg and 100 mg/kg/day Orally 4 weeks	The increase of ICP caused by TT was abolished by removal of the epithelium or by the addition of L-NAME, indicating that TT could interfere with the release of NO by endothelial cells and free nerve endings. The mechanism appears to involve the release of cAMP and partially cGMP. <i>C. officinalis</i> appears to act directly on smooth muscle cells using another pathway other than TT. Results are statistically significant.
Do et al., 2013	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats	Ethanollic and aqueous extracts 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg and 100 mg/kg/day Orally 4 weeks	The increase of ICP caused by TT was abolished by removal of the epithelium or by the addition of L-NAME, indicating that TT could interfere with the release of NO by endothelial cells and free nerve endings. The mechanism appears to involve the release of cAMP and partially cGMP. Results are statistically significant.

Supplementary Table 7. *Tribulus terrestris* and effects observed on oxidative stress.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Rajendar et al., 2011	<i>In vitro</i> and Wistar rats	Ethanollic extract 5 mg/kg/day Orally 6 weeks	Although not as efficient as alpha tocopherol, TT showed some antioxidant and metal chelating activity, attenuating the effects of cadmium in the testes. Values were statistically significant.
Sharma, Huq, & Singh, 2013	Wistar rats	Ethanollic extract 100 mg/kg/day Orally 28 days	TT attenuated degenerative effects caused by $\alpha$ -cypermethrin, which indicates antioxidant activity. Alone, TT also increases the activity of antioxidant enzymes. Data were statistically significant.
Shalaby & Hammouda, 2014	Sprague-Dawley rats	Methanollic extract of dried fruit 2.5 mg, 5 mg and 10 mg/kg/day Orally 60 days	Treatment with TT statistically increased parameters of testicular activity and antioxidant enzymes, attenuating the degenerative effects of sodium valproate in a dose-dependent manner.
Kumari & Singh, 2015	Swiss mice	Fruit extract 100 mg and 200 mg/kg/day Orally 28 days	TT was able to attenuate the deleterious effects of metronidazole in a dose-dependent manner, reducing oxidative stress. The highest dose nearly eliminates metronidazole damage. Data were statistically significant.
Sahin et al., 2016	Sprague-Dawley rats	Hydro-methanollic extract of dried fruit 300 mg/kg/day Orally 8 weeks	TT fights against oxidative stress due to the activation of the Nrf2/HO-1 pathway, which act as agents in the antioxidant response, while inhibiting MDA and NF- $\kappa$ B, which acts on the cellular response to stress. Results are statistically significant.

Supplementary Table 8. *Tribulus terrestris* and effects observed on testes function and semen quality.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Kistanova et al., 2005	Rams	TT extract (Vemo) 1.5 g per head Orally 40 days	Significant improvement in semen quality by increasing sperm count and concentration, increasing viability, motility, survival rate, and fertility.
Çek, Turan, & Atik, 2007	Fish ( <i>Poecilia reticulata</i> )	TT aqueous extract 0.05 g, 0.10 g and 0.15 g/L TT extract was put in the breeding water, larvae were exposed 8 times (once a week, 60 days)	0.15 g/L: obtaining 80% of male offspring 0.10 g and 0.15 g: average increase of weight Changes in gonads reflects improvement of spermatogenesis.
Bashir et al., 2009	Albino rats	TT extract 70 mg/kg/day Orally 20 days	Statistically increased testes weight and seminiferous tubule diameter indicate increased spermatogenesis.
Martino-Andrade et al., 2010	Wistar rats	Androsten® 11 mg, 42 mg and 110 mg/kg/day Gavage 7 days	Lower dose statistically increased the efficiency of spermatogenesis by having a higher number of spermatids resistant to homogenization.
Nikolova et al., 2010	Guinea fowl	VemoHerb-T® 10 mg/kg Put as a dietary complement 12 weeks	The weight of the left testicles increased, indicating a change in spermatogenesis and, consequently, increasing fertility.
Frydrychová et al., 2011	Boars	Preparation of Herbal Extracts ( <i>Eurycoma longifolia</i> + TT + <i>Leuzea carthamoides</i> ) 1 mg/kg/day of TT in the mixture Orally 10 weeks	Treatment caused increase in sperm concentration, abnormal sperm count and concentration of Mg ions, besides volume reduction, although it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result. Results were statistically significant.
Kavitha & Subramanian, 2011	Fish ( <i>Poecilia latipinna</i> )	TT ethanolic extract 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg and 300 mg TT extract was put in the breeding water, changed once a week 60 days	Increased body and testicular weights and altered levels of enzymes reflect increased testicular activity: ALP and ACP - improvement in spermatogenesis SDH and LDH - germ cell and epithelial maturation G6PDH - improvement in Leydig cell function Data were statistically significant.
Karimi Jashni, Malekzadeh Shiravani, & Hoshmand, 2012	Wistar rats	Hydro-alcoholic extract of fruits 2.5 mg, 5mg and 10 mg/kg/day Orally 8 weeks	Statistically increased number of primary spermatocytes at a dose of 10 mg/kg could contribute to increased sperm count.
Kavitha, Ramesh, & Subramanian, 2012	Fish ( <i>Poecilia latipinna</i> )	TT ethanolic extract 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg and 300 mg TT extract was put in the breeding water, changed once a week 60 days	Testicular histological analysis corroborates masculinizing character and molecular data found in previous work (Kavitha and Subramanian, 2011)

Interruption of supplementary table 8&gt;

&lt; Continuation of supplementary table 8:

Singh, Nair, & Gupta, 2012	Albino Wistar rats	Lyophilized aqueous extract of the dried fruits 50 mg and 100 mg/kg Orally Acute study: 50 minutes before mating Chronic study: once a day for 14 days	In chronic treatment, the sperm count and the weight of the testes increased significantly.
Mathur & Sundaramoorthy, 2013	Mice	TT ethanolic extract 500 mg/kg Orally 30 days	Reduction of testis and epididymis weight, damage to testicular histoarchitecture and drastic reduction of sperm density reflect damage to spermatogenesis probably caused by androgenic effects of TT, as a result of negative feedback. There is no mention to statistical analyses in the results of the bioassay.
Sharma, Huq, & Singh, 2013	Wistar rats	Ethanolic extract 100 mg/kg/day Orally 28 days	Treatment statistically increased testis and epididymis weight and improved semen quality parameters.
Sahoo et al., 2014	Swiss albino rats	Prepared Herbal Formulation (TT + six other herbs) 150 mg, 300 mg and 600 mg/kg/day Orally 3 weeks	Increased proportion of testicle/body rate and increase in sperm count indicate improvement in spermatogenesis. Although, it is not possible to identify the contribution of TT itself to this result. Results were statistically significant.
Shalaby & Hammouda, 2014	Sprague-Dawley rats	Methanolic extract of dried fruit 2.5 mg, 5 mg and 10 mg/kg/day Orally 60 days	Increased weight of the testicles and seminal vesicles indicate greater production. Improvement in sperm motility, counting and viability in a dose-dependent manner. Data were statistically significant.
Khaleghi et al., 2016	Human sperm <i>in vitro</i>	TT aqueous extract 20µg, 40µg e 50 µg/ml Incubation for 15, 30, 60 and 120 minutes	Dosages of 40 µg and 50 µg/ml increased motility, number of active spermatozoa, time of activity and viability. Data were statistically significant.
Roaiah et al., 2016b	Men	Ethanol, methanol, acetone or hexane extract 3 x 250 mg/day Orally 3 months	No statistically significant changes in the semen quality parameters analyzed.
Salgado et al., 2016	Men	Androsten® 3 x 250 mg/day Orally 84 days	Significant elevation of sperm concentration, motility and time of liquefaction, without alteration of morphology.

Supplementary Table 9. *Tribulus terrestris* and effects observed on the reproductive biology of females.

Author	Experimental Model	Dosages and Administration	Main Results
Nikolova et al., 2010	Guinea fowl	VemoHerb-T® 10 mg/kg Put as a dietary complement 12 weeks	TT significantly increased egg laying, egg weight and egg yolks, shell weight and thickness, and fertility.
Dehghan, Esfandiari, & Bigdeli, 2012	Wistar rats	TT hydro-ethanolic extract 5 mg and 10 mg Intraperitoneal injection 12 days	TT significantly ameliorated PCOS induced in the experiments, increased the number of corpora lutea and primary and secondary follicles, returning the ovarian activity.
Esfandiari et al., 2011	Wistar rats	TT pure extract (Goldaru) 10 mg per rat Orally 7 or 14 days	Treatment significantly increased the number of corpora lutea and the diameter of the theca interna, anticipated puberty and increased the number of secondary follicles in a dose-dependent manner.
Adaay & Mosa, 2012	Swiss albino mice	Aqueous extract 100 mg and 200 mg/kg/day Orally 2 or 4 weeks	2 weeks: the two dosages statistically increased the number of growing follicles, the diameter of mature follicles, height and number of endometrial glands. 4 weeks: Significant increase of body mass and reproductive organs, endometrium and glands in both doses. Treatments reduced estradiol levels, but with no statistical difference.
Sandeep, Bovee, & Sreejith, 2015	<i>In vitro</i> and Sprague-Dawley rats	Methanolic extract 5 mg and 10 mg Intraperitoneal injection 13 days	TT significantly attenuated the symptoms of PCOS in a dose-dependent manner, helped to regulate high levels of estradiol and progesterone and increased the number of corpora lutea, normalizing the estrous cycle at the highest dose.
Abadjieva & Kistanova, 2016	New Zealand rabbits	VemoHerb-T® 3.5 mg/kg/day Orally 45 days	Treatment caused ovarian mass gain, increased maternal instinct and offspring survival, increased follicle density. It elevated the expression of GDF-9, which favors fertility. Evidence that TT has epigenetic effects on folliculogenesis. Results are statistically significant.

## 5 CAPÍTULO II

---

### **Consumo do fitoterápico *Tribulus terrestris* não apresenta efeito androgênico e desempenha papel quimioprotetor contra o modelo de indução do câncer de próstata pela N-metil-N-nitrosourea no gerbilo da Mongólia**

Manuscrito a ser submetido ao periódico “**Phytotherapy Research**”

#### **Informações sobre os autores:**

Diego Augusto Lopes da Silva<sup>1</sup>, Eloísa Zanin Pytlowanciv<sup>2</sup>, Silvana G Pegorin de Campos<sup>3</sup>, Bianca Facchim Golçalves<sup>4</sup>, Fernanda Cristina Alcântara dos Santos<sup>5</sup>, Sebastião Roberto Taboga<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Doutor, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. E-mail: diegolopes\_silva@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Doutora, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. E-mail: eloisa.zp@gmail.com

<sup>3</sup>Doutora, Professora Substituta do Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil. E-mail: spegorin@ibilce.unesp.br

<sup>4</sup>Doutora, pós-doutorado no Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. E-mail: bianca.fgoncalves@gmail.com

<sup>5</sup>Doutora, Professora do departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. E-mail: fernanda\_alcantara@ufg.br

<sup>6</sup>Doutor, Professor do Departamento de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto, Brasil. E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

#### **Autor correspondente:**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Laboratório de Microscopia e Microanálises, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

Tel. (17) 3221-2386; Fax (17) 3221-2390

**Contagem de palavras:**

Resumo – 307 palavras, 1941 caracteres com espaços

Texto – 4779 palavras, 31248 caracteres com espaços

Número de tabelas – 1

Número de figuras – 8

**Resumo**

A planta *Tribulus terrestris* (TT) é utilizada para o tratamento de inúmeros problemas de saúde em diversas medicinas tradicionais. Uma das principais indicações é no tratamento de disfunções sexuais, supostamente por sua capacidade de interferir no metabolismo androgênico e elevar níveis séricos de testosterona. A próstata, por ser um órgão-alvo da ação dos andrógenos, é sensível às alterações hormonais. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do uso do extrato de TT sobre os níveis de testosterona e as consequências de seu uso sobre a histofisiologia prostática do gerbilo da Mongólia. 24 machos da espécie *Meriones unguiculatus* foram divididos em quatro grupos: controle experimental, controle da indução carcinogênica (50 mg/kg de N-metil-N-nitrosourea – MNU – em dose única aos 180 dias), controle dos efeitos do uso do TT (11 mg/kg em doses diárias do 180° ao 270° dia) e tratamento pós-indução (11 mg/kg em doses diárias do extrato de TT do 180° ao 270° dia, após dose única de 50 mg/kg de MNU aos 180 dias). Os resultados mostram que o TT não foi capaz de elevar os níveis séricos de testosterona e não causou alterações biométricas em órgãos sensíveis a andrógenos, o que indica baixo potencial anabolizante na dose e período de tratamento administrados. Além disso, o fitoterápico pode ter contribuído para a quimioproteção da próstata uma vez que retardou o surgimento de lesões malignas na glândula e não contribuiu para alterações na frequência dos compartimentos prostáticos. Houve uma ação específica do TT em reduzir a atividade da via androgênica canônica (diminuição de receptores de andrógenos e de proliferação de células epiteliais), sem afetar a frequência de células basais (p63 positivas), e uma tendência de aumento na frequência de apoptose. Juntos, esses dados oferecem subsídios em favor da segurança do uso do TT para a saúde prostática por não interferir negativamente no metabolismo androgênico atuante sobre a glândula e por proteger o órgão do acometimento por lesões malignas com o envelhecimento no modelo utilizado.

**Palavras-chave**

*Tribulus terrestris*, testosterona, MNU, câncer de próstata, quimioproteção.

## Introdução

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças ainda é muito comum, desde as culturas mais tradicionalistas até os países mais desenvolvidos. Em muitos casos, o uso de ervas medicinais antecede o tratamento a partir da medicina moderna, quando não o substitui, o que é comum em algumas populações com acesso restrito aos avanços médicos e tecnológicos (ADAIKAN et al., 2001; MORVIN YABESH et al., 2014). De fato, o fácil acesso, o baixo custo, o apelo histórico e cultural e a crença de que os produtos naturais não oferecem riscos à saúde faz deles uma opção atraente, mas nem sempre segura (MALVIYA et al., 2011). Isto porque o uso desses produtos é baseado em conhecimentos populares, dogmáticos e são raramente estudados experimentalmente.

O *Tribulus terrestris* (TT) se encaixa nesse contexto, visto que se trata de um fitoterápico rico em compostos biologicamente ativos, como alcaloides e glicosídeos, conhecido e utilizado há muito tempo nas medicinas tradicionais indiana, chinesa, búlgara e árabe (CHHATRE et al., 2014). Trata-se de uma planta arbustiva anual, encontrada no Mediterrâneo, em regiões de clima desértico e subtropical, tida como uma colonizadora agressiva e globalmente distribuída, razão pela qual recebe diversos nomes regionais (ADAIKAN et al., 2001). Nos tratamentos fitoterápicos, o TT é indicado como tônico, anti-hipertensivo, antidepressivo, no combate a doenças do sistema urinário, no controle do diabetes e do colesterol, na palição de doenças vasculares, no combate ao câncer e com inúmeras outras funções. Uma das indicações mais frequentes é no tratamento de disfunções sexuais, dado o efeito afrodisíaco atribuído à planta (UKANI et al., 1997; KOSTOVA & DINCHEV, 2005; CHHATRE et al., 2014).

Apesar de amplamente discutida na literatura, a principal característica utilizada na comercialização do TT como afrodisíaco é sua suposta capacidade de alterar os níveis de hormônios sexuais e gonadotrofinas. Em tese, o princípio ativo desse medicamento natural seria a protodioscina, uma saponina de natureza esteroideal encontrada em toda a planta, com maior concentração nas partes aéreas, especialmente nos frutos (MATHUR & SUNDARAMOORTHY, 2013). Segundo essa possibilidade, a protodioscina poderia atuar de três formas distintas: no aumento da expressão de receptores de andrógenos (AR) cerebrais, o que levaria ao aumento da liberação do hormônio luteinizante (LH) pela pituitária e, conseqüentemente, ao aumento da produção de testosterona (GAUTHAMAN & ADAIKAN, 2005); na simulação da enzima 5-alfarredutase, que aumentaria a conversão de testosterona em di-hidrotestosterona (DHT) periféricamente (CHHATRE et al., 2014); e o aumento da concentração de DHEA no sangue, devido à conversão direta da molécula de protodioscina

(ADIMOELJA e ADAIKAN, 1997), ou indiretamente pela estimulação da produção desse hormônio na via esteroidal pelas adrenais, devido à capacidade da protodioscina em elevar os níveis de AMPc, que pode ativar uma esterase atuante na conversão do colesterol em pregnenolona, precursora dos hormônios esteroides e que pode ser convertida em DHEA (GAUTHAMAN e GANESAN, 2008).

Dessa forma, se o TT de fato for capaz de alterar o perfil hormonal, levanta-se a hipótese de que o seu uso poderia causar algum impacto sobre a próstata, que é um órgão andrógeno-responsivo, interferindo na homeostasia prostática, já que ela está intimamente relacionada com o equilíbrio entre os hormônios esteroides (TAPLIN & HO, 2001). Assim, o fitoterápico poderia interferir na instalação de lesões da próstata, dado o consenso entre a classe médica e científica de que a maioria dos tumores prostáticos são endócrino-responsivos, isto é, dependem da sinalização provida por hormônios para instalação e ou progressão, motivo que justifica a privação androgênica como principal forma de controle do câncer prostático desde a década de 1940 (HUGGINS & HODGES, 1941).

Por outro lado, alguns estudos indicam que as saponinas teriam a capacidade de atuar como agentes quimioprotetores, auxiliando no combate à instalação e progressão tumoral. Acredita-se que algumas saponinas podem atuar de maneira similar a hormônios esteroides, produzindo, assim, algum efeito sobre órgãos sensíveis a esses hormônios, interferindo na sua homeostase de forma positiva (KIM, 2008). Saponinas presentes em extratos do TT apresentaram potencial quimioprotetor contra a indução de câncer em culturas de células hepáticas (KIM et al., 2011) e de queratinócitos expostos à radiação UVB (SISTO et al., 2012). *In vivo*, o extrato aquoso do fitoterápico demonstrou efeito protetor contra o câncer de pele induzido por 7,12 - dimetilbenzantraceno (DMBA) em camundongos (KUMAR et al., 2006). Dessa forma, a dualidade ligada ao uso da planta lança dúvida sobre a segurança de seu consumo e sobre os possíveis efeitos do TT sobre os órgãos endócrino-responsivos.

Por suas características de grande variação em sintomas e gravidade, bem como a possibilidade de diagnosticar indicativos da doença antes dela ser clinicamente comprovada e trazer riscos à saúde, o modelo de câncer de próstata é uma boa opção para estudos de quimioprevenção (POPPEL & TOMBAL, 2011). A N-metil-N-nitrosourea (MNU) é um potente agente carcinogênico que promove metilação direta de macromoléculas, inclusive proteínas e DNA (KAINA et al., 2007). Quando associada a agentes promotores de proliferação celular, a exposição ao carcinógeno pode aumentar o risco de câncer. Por este motivo, a MNU tem sido uma valiosa alternativa aos modelos experimentais quando o objetivo é estudar meios de quimioprevenção ou os agentes promocionais de tumores (BOSLAND, 1999).

Especificamente em relação ao câncer prostático, o protocolo mais utilizado é a conjugação da MNU com a testosterona, considerado um potente promotor de neoplasias (BOSLAND, 2014). Resultados positivos de indução do câncer de próstata foram alcançados usando o gerbilo da Mongólia como modelo experimental, sendo que lesões de grande importância, como neoplasias intra-epiteliais e adenocarcinomas, podem ser encontradas três meses após sua aplicação (GONÇALVES et al., 2010 e 2013).

Isto posto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade do TT em alterar os níveis séricos de testosterona e os efeitos dessa possível alteração sobre a histofisiologia prostática. Além disso, buscamos avaliar o seu potencial quimioprotetor ou promotor carcinogênico quando associado à MNU. Com isso, será possível oferecer subsídios experimentais para os questionamentos referentes ao potencial androgênico do fitoterápico, bem como à segurança de seu consumo em relação à saúde prostática.

## **Material e Métodos**

### ***Animais e delineamento experimental***

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados 24 gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). Todos os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/Unesp), sob condições de luminosidade e temperatura adequadas, e alimentação e água *ad libitum*, de acordo com as normas internas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Unesp e do COBEA (nº Proc.: 54/2011 – CEUA, anexo 11.2, página 174).

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, cada um com seis indivíduos (apêndice 10.1.1, página 171). As datas de início dos experimentos coincidiram com a entrada dos animais na fase adulta (90 dias), quando os níveis hormonais séricos se encontram estabilizados. No grupo controle experimental (C), os animais não sofreram qualquer intervenção; no grupo que representa o controle da indução carcinogênica (MNU), os animais receberam uma dose única de MNU no 180º dia e não sofreram nenhuma outra intervenção; no grupo controle dos efeitos do uso do fitoterápico (TTE), os animais receberam doses diárias do extrato a partir do 180º dia durante 90 dias; no grupo em que se analisa o tratamento com o fitoterápico após a aplicação de MNU (MNU+TTE), os animais receberam uma dose única de MNU no 180º dia e, somente após essa exposição, receberam doses diárias do extrato por 90 dias.

### ***Drogas e dosagens***

A administração de MNU se deu por injeção intraperitoneal em dose única (0,25 ml; 50 mg/kg) do carcinógeno N-metil-N-nitrosourea (CAS 684-93-5; Sigma, St. Louis, MO). A droga foi pré-diluída em tampão citrato de sódio com pH 6,0 (modificado de GONÇALVES et al., 2010) no momento do uso. O extrato de TT, produzido a partir da maceração do fruto seco, é de origem chinesa e foi adquirido em farmácia de manipulação (lote LXCJ120503#5). O grau de pureza é de 45% (48,24 % de saponinas, segundo laudo de controle de qualidade, anexo 11.1, página 173). A administração diária do extrato foi feita por gavagem (0,5 ml; 11 mg/kg), após o fitoterápico ter sido suspenso em água destilada no momento do uso (MARTINO-ANDRADE et al., 2010). A opção pelo uso do extrato seco e não do componente ativo purificado simula o uso costumeiro desse fitoterápico e a dose utilizada é compatível com a dose aplicada a humanos.

### ***Biometria e morte***

Os gerbilos foram pesados aos 90, 180 e 270 dias para análise da alteração da massa corporal e foram mortos no 270º dia, com nove meses de idade. Todos foram submetidos à inalação de CO<sub>2</sub> e, depois de pesados, foram decapitados para a coleta do sangue, que foi submetido à dosagem hormonal. Foram removidos e pesados os complexos prostáticos (próstata + vesícula seminal + uretra prostática), os testículos e as adrenais. Os lobos ventrais das próstatas foram isolados, devidamente pesados e fixados de acordo com a metodologia adequada para cada uma das análises.

### ***Dosagem hormonal***

As amostras de sangue foram coletadas logo após a decapitação em tubos de ensaio de 4 ml com gel de separação. O material foi centrifugado durante 20 minutos, a 3.000 rpm, e o soro separado e congelado em *biofreezer* a -80°C para posterior análise dos níveis de testosterona. A análise foi feita por ELISA, utilizando-se o kit comercial específico (Testosterone EIA Kit, número no catálogo 582701, Cayman Chemical Company, MI) de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante, utilizando-se de 50 µl de cada amostra previamente congelada, diluída em 10 vezes. O limite de detecção para a testosterona foi de 6 pg/ml. As leituras foram feitas com o equipamento Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, VT, USA).

### ***Obtenção de cortes histológicos***

Os lobos ventrais coletados e destinados à análise morfológica foram fixados por imersão. Três deles foram imersos em paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato (0,2M, pH 7,2) durante 24 horas, e três foram imersos em metacarn (metanol, clorofórmio e ácido acético, 6: 3: 1) durante três horas. Em seguida, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído em parafina (Histosec - MERK). Os blocos de parafina contendo o material para análise foram seccionados em micrótomo rotativo, produzindo cortes de 5 µm, coletados em lâminas de vidro silanizadas para as devidas colorações.

### ***Análise morfológica***

Para avaliar as diferenças morfológicas nos diferentes grupos experimentais, cortes histológicos foram submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina (HE) e Reticulina de Gömori, as quais permitiram analisar a estrutura glandular, fazer quantificações celulares e de lesões (MELLO & VIDAL, 1980). As avaliações foram feitas em microscopia de luz e as imagens histológicas foram digitalizadas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens - Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics, ou digitalizadas a partir do scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI) e ao sistema analisador de imagens Olympus OlyVIA 2.9 (Build 13735) ©Olympus Soft Imaging Solutions GmbH.

### ***Análise estereológica***

A análise estereológica foi realizada para a obtenção da frequência relativa dos diferentes compartimentos prostáticos (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não-muscular) dos grupos em estudo. Para isso, foram capturados 48 campos aleatórios por grupo, divididos igualmente entre os seis animais de cada grupo (8 campos por animal), a partir de lâminas coradas pela HE, através do scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI), no aumento de 200x. As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1978). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, obteve-se a frequência relativa (porcentagem) dos compartimentos prostáticos. Para o cálculo de frequência relativa dos compartimentos utilizaram-se os pontos do Sistema-teste que coincidem com cada compartimento e esses números de pontos foram transformados em porcentagem.

### ***Contagem de lesões***

Para fazer a quantificação de lesões neoplásicas, foram separadas quatro lâminas de cada animal, contendo cortes de diferentes profundidades do material incluído (90 µm de distância entre cada ponto). Com isso, em cada grupo experimental foram utilizadas 24 imagens de cortes corados em HE e digitalizados com scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI) no aumento de 200x. A partir de uma varredura de toda a extensão dessas secções com o sistema analisador de imagens Olympus OlyVIA 2.9 (Build 13735) ©Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, foram contados os focos de lesões neoplásicas. Cortes adjacentes àqueles em que foram detectadas lesões proliferativas foram então submetidos à técnica da Reticulina de Gömori, de forma que foi possível classificar as lesões em pré-malignas, quando elas eram restritas ao compartimento epitelial e acinar, ou malignas, quando foi observado o rompimento da membrana basal dos ácinos glandulares e a invasão das células proliferativas para outros compartimentos prostáticos. A partir do número obtido, foi calculada a multiplicidade de lesões pré-malignas e malignas em cada grupo experimental (média de cada tipo de lesão por corte).

### ***Análise imunoistoquímica***

Foram realizadas reações imunoistoquímicas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em cortes previamente fixados em metacarn e para o receptor de andrógeno (AR) e marcador de células basais (p63) em cortes histológicos da próstata previamente fixados em paraformaldeído tamponado. Resumidamente, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (10 mM, pH 6,0) a 98°C por 50 min. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi feito através da incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 20 min, seguido de permeabilização em Triton 0,2% por 15 min. O bloqueio das interações proteicas inespecíficas foi realizado em leite 5% em TBS por 30 min em temperatura ambiente. Em sequência os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-PCNA (1:100, mouse monoclonal, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluído em BSA1%, durante 1 h a 37°C, ou anti-AR (1:75, rabbit policlonal, sc816, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-p63 (1:100. Mouse monoclonal, 4A4: sc-8431, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) overnight a 4°C. Após serem lavados em TBS (acrescido de NP40 para o AR) a interação antígeno-anticorpo para o PCNA e para a p63 foi detectada usando o kit Max Polymer (Novocastra, RE7260-K, Leica Biosystems) por 30 min cada etapa ou para o AR os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotinilado anti-rabbit e então imersos em complexo avidina/biotina (Rabbit ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology,

SantaCruz, CA) por 45 min a 37°C. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina-DAB (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako, K3468) e a contracoloração foi realizada em hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido com a omissão do anticorpo primário.

A contagem das células PCNA-positivas foi realizada nos compartimentos epitelial e estromal em toda a extensão do fragmento e o total foi dividido pela área do corte, obtendo-se, assim, a densidade de células em proliferação nos dois compartimentos (células positivas por mm<sup>2</sup>). Para isso, toda a extensão do corte em três profundidades diferentes (cerca de 60 µm de distância) do mesmo LV foi digitalizada em scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI) no aumento de 200x.

A frequência relativa de células AR-positivas e de células basais p63-positivas foi estimada através do total de células marcadas e não marcadas no epitélio e estroma no caso do AR e epitélio no caso da p63 a partir de 10 imagens contíguas, digitalizados no aumento de 400x. Ambas as contagens foram feitas com o auxílio do programa Image Pro Plus Media Cybernetics version 4.5 for Windows (MD, USA) em 3 animais por grupo, com um n amostral de 4693 - 6198 células por grupo experimental na análise do AR total e 2676 – 3907 células por grupo experimental na análise da p63.

### ***Detecção de células apoptóticas***

A identificação das células apoptóticas foi efetuada com base na reação de TUNEL-Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TdT-Fragel- Calbiochem, CN Biosciences, La Jolla, CA, USA). Essa foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Após digestão enzimática com Proteinase K, os cortes foram tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 5 min, para o bloqueio da atividade de peroxidase endógena. Seguiu-se a incubação com a enzima deoxinucleotidil terminal transferase (TdT, 1:20) durante 1 hora para a detecção dos fragmentos de cromatina que se formam durante a apoptose. Ao final da reação, os nucleotídeos biotinilados foram reconhecidos por estreptoavidina conjugada com peroxidase e revelados com diaminobenzidina por 5 minutos (0,07%). Os cortes foram contracorados com hematoxilina. A densidade das células apoptóticas foi obtida da mesma maneira que a contagem das células PCNA-positivas, nos compartimentos epitelial, luminal (células liberadas no lúmen) e estromal em toda a extensão do corte.

### ***Análise estatística***

Os parâmetros quantitativos do trabalho foram avaliados estatisticamente pelo software Statistica 7.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2004, Tulsa, OK, USA). Os dados foram testados considerando os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os grupos que assumiram esses pressupostos (dados paramétricos) foram comparados aplicando teste de one-way ANOVA seguido de Tukey (post hoc). Os dados que não se enquadraram nesses pressupostos (dados não paramétricos) foram comparados aplicando o teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (post hoc). Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

#### ***As intervenções não causaram alterações nos dados biométricos***

Considerando-se cada momento de mensuração da massa corporal (90, 180 e 270 dias), não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (tabela 1). O mesmo se diz da massa do complexo prostático ou do lobo ventral da próstata isolado, das adrenais e dos testículos. De maneira geral, os animais do mesmo grupo experimental apresentaram uma tendência de ganho de massa corporal com o passar dos meses.

#### ***O uso oral de TT não alterou os níveis séricos de testosterona***

Apesar dos grupos TTE ( $1,31 \text{ ng/ml} \pm 0,13$ ; média  $\pm$  EP) e MNU+TTE ( $1,45 \pm 0,26$ ) terem apresentado um leve aumento nos níveis séricos de testosterona em relação ao grupo C ( $1,05 \pm 0,19$ ), todos eles ficaram abaixo dos níveis apresentados pelo grupo MNU ( $1,92 \pm 0,47$ ), que não recebeu doses do extrato. No entanto, a intervenção não causou alterações estatisticamente relevantes nos níveis séricos de testosterona em nenhuma das situações experimentais ( $p = 0,2658$ ).

#### ***TT inibe alterações morfológicas causadas pela exposição ao carcinógeno MNU***

A descrição usual para a organização tecidual da próstata foi observada no material analisado: conjunto de ácinos e ductos formados por um epitélio cúbico a prismático, simples ou pseudoestratificado, circunscrito por um estroma fibromuscular (figuras 1 e 2). Entretanto, alterações epiteliais como hiperplasias, metaplasias e arcos intra-epiteliais foram observadas em todos os grupos, bem como focos inflamatórios periductais e intraluminais (figura 1). Lesões microinvasivas apresentaram ruptura da região da membrana basal e extravasamento de

células epiteliais no estroma subjacente, o que foi mais bem evidenciado pela fragmentação de fibras reticulares (figura 2).

A análise quantitativa da multiplicidade de lesões neoplásicas (figura 3) mostrou o aumento mais expressivo no grupo MNU ( $2,17 \pm 0,36$ ), único com diferença significativa para C ( $1,04 \pm 0,49$ ). O uso do extrato sozinho não provocou aumento significativo do número de lesões no grupo TTE ( $1,29 \pm 0,48$ ) e, apesar de não apresentar diferença estatística, o grupo MNU+TTE apresentou o menor valor para a multiplicidade de neoplasias ( $0,88 \pm 0,30$ ). Em se considerando apenas as lesões pré-malignas, não há diferenças significantes entre os grupos analisados, enquanto que o grupo MNU apresentou o maior número de lesões malignas ( $0,75 \pm 0,23$ ).

A análise estereológica indica um aumento de 41,4% na frequência do compartimento epitelial no grupo MNU ( $40,91 \pm 1,96$ ) em relação ao grupo C ( $28,93 \pm 1,54$ ) e de 45,5% em relação ao grupo TTE ( $28,12 \pm 1,62$ ). O grupo MNU+TTE ( $34,92 \pm 2,08$ ) apresentou frequência estatisticamente maior apenas em relação ao grupo TTE (figura 4). Se considerarmos apenas a porção epitelial com característica proliferativa, o grupo MNU ( $9,52 \pm 2,67$ ) apresentou valores significativamente maiores em relação ao grupo MNU+TTE ( $1,27 \pm 0,67$ ) ( $p < 0,0001$ , dados omitidos da figura 4). O lúmen acinar do grupo MNU diminuiu significativamente em frequência em relação ao grupo C ( $34,31 \pm 2,20$  e  $43,73 \pm 1,91$ , respectivamente). Em relação ao estroma muscular, apenas o grupo TTE ( $10,37 \pm 0,58$ ) apresentou frequência desse compartimento menor que o grupo C ( $13,30 \pm 0,63$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos no que diz respeito à frequência do compartimento estromal não-muscular.

***Tratamentos reduziram a frequência de células AR-positivas, mas não interferiu na população de células basais (p63-positivas)***

A frequência de células AR-positivas (figura 5) foi alta no epitélio de todos os grupos (acima de 80%), diminuindo aproximadamente 6,92% no grupo MNU+TTE ( $80,80 \pm 2,05$ ) em comparação com o grupo C ( $86,81 \pm 2,15$ ). Já a frequência de AR no estroma não apresentou diferenças significativas entre os grupos. A imunorreatividade total indica uma redução de 8,54 % nas células AR-positivas do grupo MNU+TTE ( $67,99 \pm 1,82$ ) em relação ao grupo C ( $74,34 \pm 2,11$ ). A frequência de células basais, marcadas positivamente para a p63, não sofreu alterações entre os grupos (figura 6).

***TT inibe a proliferação celular, mas interfere pouco na densidade de células apoptóticas***

A densidade de células epiteliais PCNA-positivas (figura 7) indicaram uma significativa ação antiproliferativa do TT no grupo TTE quando comparado com o grupo MNU ( $21,11 \pm 9,08$  e  $80,09 \pm 21,56$ , respectivamente), o mesmo ocorrendo quanto à densidade de células estromais PCNA-positivas (TTE  $15,53 \pm 5,14$  e MNU  $61,01 \pm 9,02$ , respectivamente). A imunorreatividade total corrobora o observado nos dois compartimentos, com diferenças estatísticas entre TTE ( $37,64 \pm 14,06$ ) e MNU ( $141,20 \pm 29,98$ ). A taxa de apoptose sofreu um leve aumento nos grupos MNU, TTE e MNU+TTE em relação ao C, embora não tenha alcançado valores estatisticamente relevantes (figura 8).

**Discussão**

O fato de preparados herbais a base de TT serem utilizados com o objetivo de tratar sintomas da disfunção sexual em diferentes culturas, fez com que as empresas farmacêuticas se interessassem em conhecer os compostos químicos responsáveis pelos supostos efeitos farmacológicos da planta. Inicialmente, os esforços se concentraram em caracterizar a composição química de diferentes partes do vegetal (ISMAIL et al, 2014). Devido à grande quantidade e à natureza esteroidal da protodioscina, e por se acreditar que os outros compostos fossem farmacologicamente inativos, esta saponina foi coroada como o principal princípio ativo do fitoterápico a base de TT (ADAIKAN et al., 2001). Desde a primeira patente até hoje, o TT tem sido comercializado com a promessa de interferir no metabolismo de andrógenos, elevando as taxas de LH, testosterona, DHEA e DHT.

No entanto, são escassos os dados na literatura que corroboram essa possibilidade de ação do TT. A maior parte dos experimentos realizados com humanos e animais mostram que o extrato não é eficiente na elevação dos níveis de testosterona (NEYCHEV & MITEV, 2005; KUMARI & SINGH, 2015; ROAIAH et al., 2016). O presente trabalho reforça esses achados, uma vez que a utilização do TT não foi capaz de elevar os níveis de testosterona sérica e, conseqüentemente, não foram constatadas ações anabolizantes nos parâmetros biométricos coletados do complexo prostático e do lobo ventral da próstata, dos testículos e adrenais do gerbilo da Mongólia. Em acordo com esses dados, o extrato de TT não causou mudanças significantes nos níveis de testosterona e não produziu efeito estimulatório em órgãos endócrino-sensíveis, como a próstata, vesícula seminal, útero ou vagina num estudo realizado com machos e fêmeas de ratos Wistar (MARTINO-ANDRADE, 2010).

O fato de todos os grupos terem apresentado lesões prostáticas pode estar relacionado com a idade dos animais, já que desordens proliferativas benignas são comuns na

próstata do gerbilo como consequência do envelhecimento (CAMPOS et al., 2008). Experimentos realizados com roedores mostraram que a testosterona tem um papel importante na instalação e progressão tumoral, já que a maioria dos tumores prostáticos são endócrino-responsivos (TAPLIN & HO, 2001). O modelo de indução tumoral utilizando a combinação de MNU e testosterona já foi executado em nosso laboratório e indica que esse hormônio pode antecipar o surgimento de lesões malignas no lobo ventral da próstata do gerbilo, funcionando como um gatilho para a instalação tumoral (GONÇALVES et al., 2010 e 2013). O presente trabalho mostrou que, apesar de o TT não alterar a multiplicidade de lesões pré-malignas, ele diminuiu o desenvolvimento de lesões malignas, especialmente quando comparados com o grupo MNU. Esses dados reiteram a falta de potencial androgênico do fitoterápico. Além disso, o fato do grupo MNU+TTE apresentar a menor multiplicidade total de lesões indica que o TT não só falha em desempenhar o papel de gatilho para a instalação de lesões provocadas pela MNU, como faria caso elevasse o nível de testosterona, como pode ainda desempenhar papel quimioprotetor.

O TT interfere na cinética de proliferação das células epiteliais luminiais, mas não interfere no compartimento basal. Índícios da capacidade antiproliferativa do TT reforçam a possibilidade do papel quimioprotetor do extrato e já foram relatados em ensaios realizados com cultura de melanócitos (DENG et al., 2002), de células de câncer mamário da linhagem Bcap-37 (SUN et al., 2003) e em células prostáticas da linhagem PC-3 (WEI et al., 2014). Nossos resultados sugerem que o mesmo efeito pode ser observado *in vivo*. Os grupos cujos tratamentos incluíram o TT tiveram as menores taxas de proliferação, especialmente em comparação com o grupo MNU. As frações de saponinas e flavonoides extraídas da erva *Gynostemma pentaphyllum* se mostraram eficientes no combate à proliferação de células de câncer prostático da linhagem PC-3 pelo interrompimento do ciclo celular nas fases S e G2/M através da modulação da expressão de ciclinas, bem como pela indução de apoptose, por meio da redução na expressão de proteínas antiapoptóticas e aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas (CHENG et al., 2011). Esses dados dialogam com outros trabalhos que sugerem que as saponinas atuam como indutoras de apoptose (SUN et al., 2004; YANG et al., 2005). Embora não tenha apresentado valores estatisticamente significantes, nós observamos uma tendência de aumento na densidade de células apoptóticas de todos os grupos experimentais em relação ao controle.

Os resultados encontrados para a marcação de AR indicam que, além de não contribuir para o aumento dos níveis de testosterona, o TT pode ter efeito antiandrogênico, já que ele causou redução na frequência de AR em praticamente todas as situações analisadas,

com diferença estatística em algumas delas. De acordo com um estudo conduzido por Sandeep e colaboradores, o TT mostrou atividade antiandrogênica *in vitro* e foi capaz de atenuar os sintomas da síndrome do ovário policístico em fêmeas de ratos Sprague-Dawley, a qual é influenciada por andrógenos, de maneira dependente da dose. Os autores defendem que o TT pode ser capaz de reduzir o nível de testosterona, inibir a atividade transcricional do AR e, assim, prevenir a resposta fisiológica a andrógenos *in vivo* (SANDEEP et al., 2015). No gerbilo constatou-se resposta semelhante uma vez que houve uma ação específica de TT em reduzir a atividade da via androgênica canônica, caracterizada pela redução de células AR positivas e diminuição da proliferação de células epiteliais.

O TT é rico em compostos biologicamente ativos e o destaque dado à protodioscina pode ser inadequado. Outros trabalhos conduzidos com outras saponinas indicam que elas podem ter uma função na proteção contra o câncer. Saponinas presentes no próprio TT foram testadas em diferentes linhagens de células e mostraram que são eficientes em auxiliar o combate ao câncer. A própria protodioscina exibiu desempenho citotóxico em diversas linhagens de células, inclusive linhagens do câncer de próstata, no *Anticancer Drug Screen Panel* do Instituto Nacional do Câncer Americano (HU & YAO, 2002). Um estudo comparativo entre uma mistura herbal (TT e *Murraya koenigii*) e tamsulosin, um medicamento usado para tratamento da hiperplasia benigna prostática (HBP), mostrou que o preparado natural tem desempenho satisfatório no tratamento dos sintomas da HBP inicial (SENGUPTA et al., 2011).

Tomados juntos, esses dados oferecem subsídios em defesa de que o consumo de TT não oferece riscos à histofisiologia prostática relacionados à desregulação endócrina ou com o metabolismo de andrógenos *in vivo*. Ao contrário, a análise morfológica desempenhada neste trabalho indica que o consumo do extrato seco da planta pode ter potencial quimioprotetor, como já sugerido em experimentos realizados com células em cultura. Embora este trabalho inicial indique que o tratamento com TT em animais propensos ao desenvolvimento do câncer prostático pode minimizar a incidência de lesões malignas com o envelhecimento, os dados referentes à segurança do uso do TT não são conclusivos, já que o mesmo não pode ser dito em relação às lesões pré-malignas. Nosso grupo de pesquisa planeja desenvolver, a seguir, estudos morfológicos com tratamentos que simulam o uso do TT por tempo prolongado e estudos moleculares que visam entender melhor os mecanismos pelos quais o TT pode influenciar a morfofisiologia da próstata *in vivo*.

## **Conclusão**

Nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho, o TT não foi capaz de provocar a elevação dos níveis de testosterona e não alterou parâmetros biométricos de órgãos andrógeno-sensíveis do gerbilo da Mongólia, o que permite inferir que o fitoterápico não apresenta efeito anabolizante neste modelo experimental. Além disso, a combinação de TT com o carcinógeno MNU não antecipou a instalação de lesões malignas no lobo ventral da próstata. Ao contrário, o extrato mostrou efeito quimioprotetor, reduzindo o número de lesões totais, especialmente as lesões malignas, quando comparado com o grupo controle da indução (grupo MNU), reduzindo a densidade de células em proliferação e a frequência de células AR-positivas. Juntos, esses dados oferecem subsídios em favor da utilidade do uso do TT como auxiliar no combate à invasividade de lesões prostáticas proliferativas. No entanto, estudos ainda são necessários para saber a real influência do TT sobre as lesões pré-malignas, que persistiram mesmo após os tratamentos, e entender de que forma o extrato pode auxiliar no bloqueio da transição de lesões pré-malignas para malignas.

## **Isenção de responsabilidades:**

As opiniões expressas neste artigo são de responsabilidade dos autores e não representa a posição oficial da instituição ou do financiador. O manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores.

## **Recursos financeiros:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº Proc.: 2014/26660-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº Proc.: 305840/2015-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, bolsa concedida por um ano).

## **Conflito de Interesses:**

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

## **Referências Bibliográficas**

ADAIKAN, P. G.; GAUTHAMAN, K.; PRASAD, R. N. V. History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*. **The Aging Male**, v. 4, p. 163–169, 2001.

- ADIMOELJA, A.; ADAIKAN, P. G. Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L improves the male sexual functions, probably via DHEA. **International Journal of Impotence Research**, v. 9, n. 1, 1997.
- BOSLAND, M. C. Use of animal models in defining efficacy of chemoprevention agents against prostate cancer. **European Urology**, v. 35, n. 5–6, p. 459–463, 1999.
- BOSLAND, M. C. Testosterone treatment is a potent tumor promoter for the rat prostate. **Endocrinology**, v. 155, n. 12, p. 4629–4633, 2014.
- CAMPOS, S. G. et al. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 1, p. 13–24, 2008.
- CHENG, T.-C. et al. Antiproliferation effect and apoptosis mechanism of prostate cancer cell PC-3 by flavonoids and saponins prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11319–11329, 2011.
- CHHATRE, S. et al. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. **Pharmacognosy Review**, v. 8, n. 15, p. 45–51, 2014.
- DENG, Y.; YANG, L.; AN, S. Effect of *Tribulus terrestris* L decoction of different concentrations on tyrosinase activity and the proliferation of melanocytes. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 22, n. 11, p. 1017–1019, 2002.
- GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G. Effect of *Tribulus terrestris* on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity and androgen receptors in rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 127–132, 2005.
- GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction - an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, v. 15, p. 44–54, 2008.
- GONÇALVES, B. F. et al. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, p. 96–106, 2010.
- GONÇALVES, B. F. et al. A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **Prostate**, v. 73, n. 11, p. 1202–1213, 2013.

HU, K.; YAO, X. Protodioscin (NSC-698 796): its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in anticancer drug screen panel. **Planta Medica**, v. 68, p. 297–301, 2002.

HUGGINS, C.; HODGES, C. V. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. **Cancer Research**, v. 1, p. 293–297, 1941.

ISMAIL, S. B. et al. Comparison on the effects and safety of Tualang honey and Tribestan in sperm parameters, erectile function, and hormonal profiles among oligospermic males. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–10, 2014.

KAINA, B. et al. MGMT : Key node in the battle against genotoxicity , carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair**, v. 6, p. 1079–1099, 2007.

KIM, H. J. et al. Aqueous extract of Tribulus terrestris Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF- $\kappa$ B signaling in liver cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 197–203, 2011.

KIM, J. Protective effects of Asian dietary items on cancers - Soy and Ginseng. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 9, p. 543–548, 2008.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in Tribulus terrestris - chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 111–137, 2005.

KUMAR, M. et al. Chemopreventive potential of Tribulus terrestris against 7,12- dimethylbenz (a) anthracene induced skin papillomagenesis in mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 289–294, 2006.

KUMARI, M.; SINGH, P. Tribulus terrestris ameliorates metronidazole--induced spermatogenic inhibition and testicular oxidative stress in the laboratory mouse. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 304–310, 2015.

MALVIYA, N. et al. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction - a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 68, n. 1, p. 3–8, 2011.

MARTINO-ANDRADE, A. J. et al. Effects of Tribulus terrestris on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 165–170, 2010.

MATHUR, M.; SUNDARAMOORTHY, S. Ethnopharmacological studies of Tribulus

terrestris (Linn). in relation to its aphrodisiac properties. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 1, p. 83–94, 2013.

MELLO, M. L. S.; Vidal, B. C. **Práticas de biologia celular**. Campinas: Edgard Blücher-Funcamp, 1980. 71p.

MORVIN YABESH, J. E.; PRABHU, S.; VIJAYAKUMAR, S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 774–789, 2014.

NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 319–323, 2005.

POPPEL, H. VAN; TOMBAL, B. Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements. **Cancer Management and Research**, v. 3, p. 91–100, 2011.

ROAIAH, M. F. et al. Prospective analysis on the effect of botanical medicine (*Tribulus terrestris*) on serum testosterone level and semen parameters in males with unexplained infertility. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, p. 1–7, 2016.

SANDEEP, P. M.; BOVEE, T. F. H.; SREEJITH, K. Anti-androgenic activity of *Nardostachys jatamansi* DC and *Tribulus terrestris* L. and their beneficial effects on polycystic ovary syndrome – Induced rat models. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 13, n. 6, p. 248–254, 2015.

SENGUPTA, G. et al. Comparison of *Murraya koenigii*- and *Tribulus terrestris*-Based Oral Formulation Versus Tamsulosin in the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia in Men Aged >50 Years: A Double-Blind, Double-Dummy, Randomized Controlled Trial. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 12, p. 1943–1952, 2011.

SISTO, M. et al. Saponins from *Tribulus terrestris* L. protect human keratinocytes from UVB-induced damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 193–201, 2012.

SUN, B. et al. Investigation on inhibitory and apoptosis-inducing effects of saponins from *Tribulus terrestris* on hepatoma cellline BEL-7402. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 29, n. 7, p. 681–684, 2004.

SUN, B.; QU, W.; BAI, Z. The inhibitory effect of saponins from *Tribulus terrestris* on Bcap-

- 37 breast cancer cell line in vitro. **Zhong Yao Cai**, v. 26, n. 2, p. 104–106., 2003.
- TAPLIN, M. E.; HO, S.-M. The Endocrinology of Prostate Cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3467–3477, 2011.
- UKANI, M. D.; NANAVATI, D. D.; MEHTA, N. K. A review on the Ayurvedic herb Tribulus terrestris L. **Ancient Science of Life**, v. 17, n. 2, p. 144–150, 1997.
- WEI, S. et al. Terrestrosin D, a steroidal saponin from tribulus terrestris L., inhibits growth and angiogenesis of human prostate cancer in vitro and in vivo. **Pathobiology**, v. 81, p. 123–132, 2014.
- WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, v. 12, p. 131-155, 1978.
- YANG, H.; QU, W.; SUN, B. Experimental study of saponins from Tribulus terrestris on renal carcinoma cell line. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 30, n. 16, p. 1271–1274, 2005.

### Legendas das figuras

Figura 1. *Tribulus terrestris* inibe alterações morfológicas causadas pela exposição ao carcinógeno MNU: cortes histológicos do lobo ventral da glândula prostática masculina do gerbilo corados com Hematoxilina e Eosina. Controle (C): [A] aspecto morfológico normal da próstata. [B] alteração morfológica semelhante a NIP observada nos animais do grupo controle. Indução carcinogênica com N-metil-N-nitrosourea (MNU): [C] e [D] presença de numerosos focos de lesões proliferativas (NIP) e inflamatórias periductais (seta preta) e intraluminais (cabeça de seta). Efeitos do fitoterápico (TTE): [E] e [F] também se observam lesões do tipo NIP e arcos intra-epiteliais (AI). Efeitos combinados do fitoterápico e do agente carcinogênico (MNU+TTE): [G] e [H] o tratamento parece reduzir a frequência de lesões do tipo NIP, especialmente em relação ao grupo MNU. Os detalhes evidenciam a diversidade fenotípica nuclear nas regiões onde se observam lesões proliferativas. As setas brancas indicam células com núcleo descompactado e nucléolos evidentes, comuns nesse tipo de lesão. Ep: epitélio; Es: estroma; Lu: lúmen.

Figura 2. Embora todos os grupos apresentem lesões malignas, os grupos com aplicação de *Tribulus terrestris* apresentam os menores valores para este tipo de lesão: cortes histológicos do lobo ventral da glândula prostática masculina do gerbilo corados com Reticulina de Gömori. As lesões do tipo NIP em que foram observadas rupturas da membrana basal e extravasamento de células para outros compartimentos foram consideradas lesões malignas. As setas finas demonstram a organização normal das fibras reticulares que formam o arcabouço dos ácinos glandulares. As setas brancas indicam o local de rompimento da membrana basal. As setas pretas largas indicam fenótipo nuclear de células proliferativas dispersas no estroma glandular. Ep: epitélio; Es: estroma; Lu: lúmen.

Figura 3. Análise estatística da multiplicidade de lesões encontradas no lobo ventral da próstata de machos do gerbilo da Mongólia sugere que o *Tribulus terrestris* pode ter papel quimioprotetor. Os menores índices de lesões são encontrados nos grupos que receberam doses do fitoterápico, especialmente no que se refere às lesões malignas. Os asteriscos (\*) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p < 0,05$ ).

Figura 4. Os dados estereológicos evidenciam a plasticidade dos compartimentos glandulares no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia e indicam que o *Tribulus terrestris* não tem capacidade de induzir a proliferação. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. [A] Frequência do compartimento epitelial. \*\*\* diferença estatística em relação ao C e TTE ( $p < 0,0001$ ); \* diferença estatística em relação ao TTE ( $p < 0,05$ ). [B] Frequência do compartimento luminal. \* diferença estatística em relação ao C ( $p < 0,05$ ); \*\*\* diferença estatística em relação a MNU e MNU+TTE ( $p < 0,0001$ ). [C] Frequência do compartimento estromal muscular. \*\* diferença estatística em relação ao C ( $p = 0,0077$ ). [D] Frequência do compartimento estromal não-muscular. Não há diferenças entre os grupos (One-way ANOVA/Tukey, dados paramétricos).

Figura 5. *Tribulus terrestris* causa redução da marcação de células AR-positivas no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia. [A] Frequência de células AR-positivas por campo no compartimento epitelial. [B] Frequência de células AR-positivas por campo no compartimento estromal. [C] Frequência total de células AR-positivas por campo. Os asteriscos (\*) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p < 0,05$ ). [D]-[G] Marcação de células AR-positivas (setas escuras) e AR-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [H] Controle negativo.

Figura 6. *Tribulus terrestris* não interfere na frequência de células epiteliais basais no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia. [A] Frequência de células basais p63-positivas por campo no compartimento epitelial. Não há diferenças significantes entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p > 0,05$ ). [B]-[E] Marcação de células p63-positivas (setas escuras) e p63-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [F] Controle negativo.

Figura 7. Uso do *Tribulus terrestris* apresenta efeito antiproliferativo no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia, segundo marcação para o PCNA. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p < 0,05$ ). [A] Densidade de células PCNA-positivas por corte no compartimento epitelial ( $p < 0,05$ ). [B] Densidade de células PCNA-positivas por corte no compartimento estromal ( $p = 0,0091$ ). [C] Densidade total de células PCNA-positivas por corte ( $p < 0,05$ ). [D]-[G] Marcação

de células PCNA-positivas (setas escuras) e PCNA-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [H] Controle negativo.

Figura 8. *Tribulus terrestris* indica tendência de aumento nos eventos de apoptose no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia. [A] Densidade de células TUNEL-positivas por corte no compartimento epitelial. [B] Densidade de células TUNEL-positivas por corte no compartimento luminal. [C] Densidade de células TUNEL-positivas por corte no compartimento estromal. [D] Densidade total de células TUNEL-positivas por corte. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p > 0,05$ ). [E]-[H] Marcação de células TUNEL-positivas (setas escuras) e TUNEL-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [I] Controle negativo.

### **Legenda da tabela**

Tabela 1. Os tratamentos aplicados não causaram alterações nos dados biométricos para a massa corporal, complexo prostático (próstata + vesícula seminal + uretra prostática), lobo ventral isolado (LV), testículos e adrenais.

Rodapé: Os dados são expressos em gramas (média  $\pm$  EP). Os valores apresentados para testículo e adrenal foram obtidos a partir da média entre o par de órgãos. n: número de animais por grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p > 0,05$ ).

Figuras

Figura 1

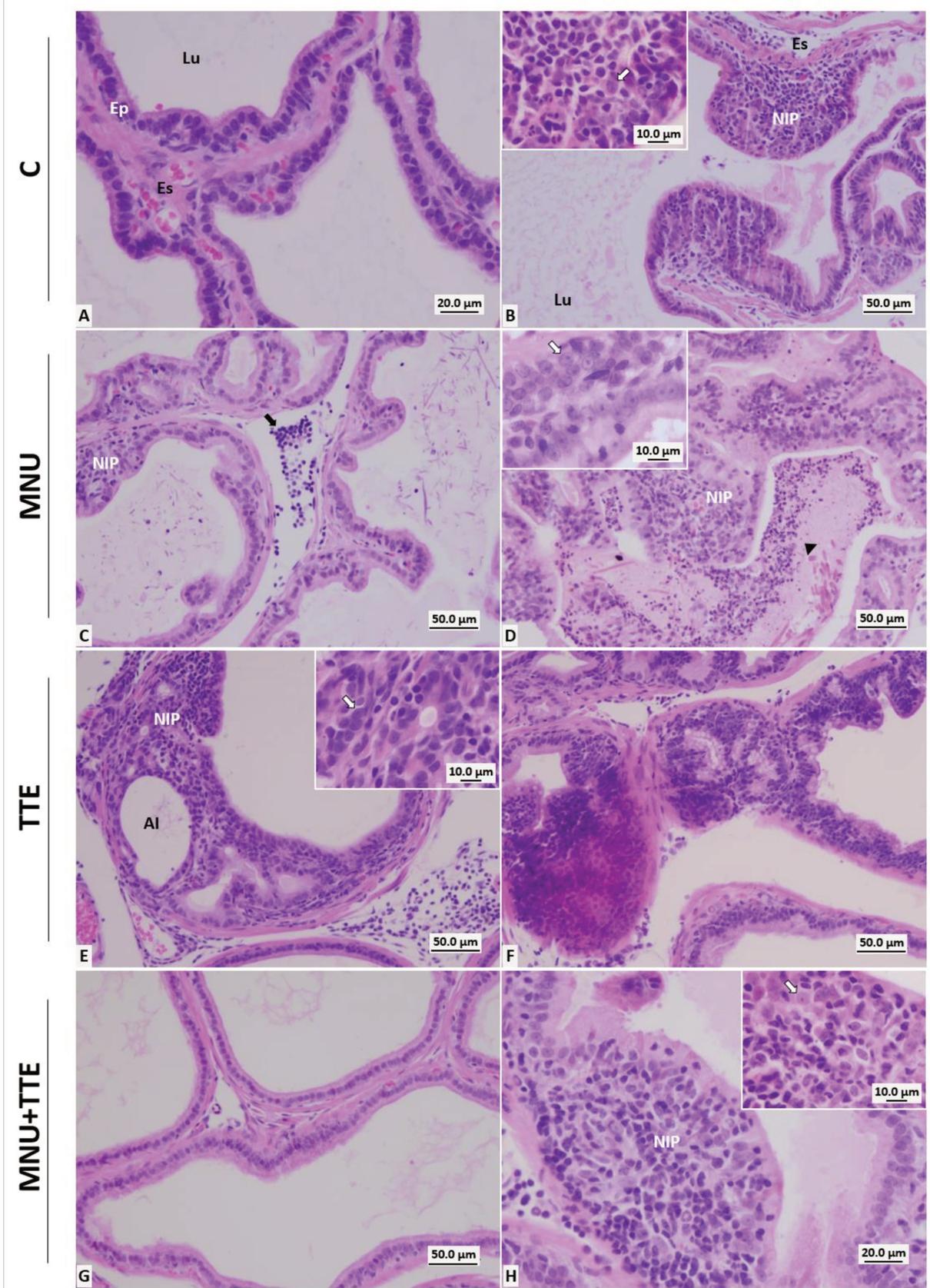


Figura 2

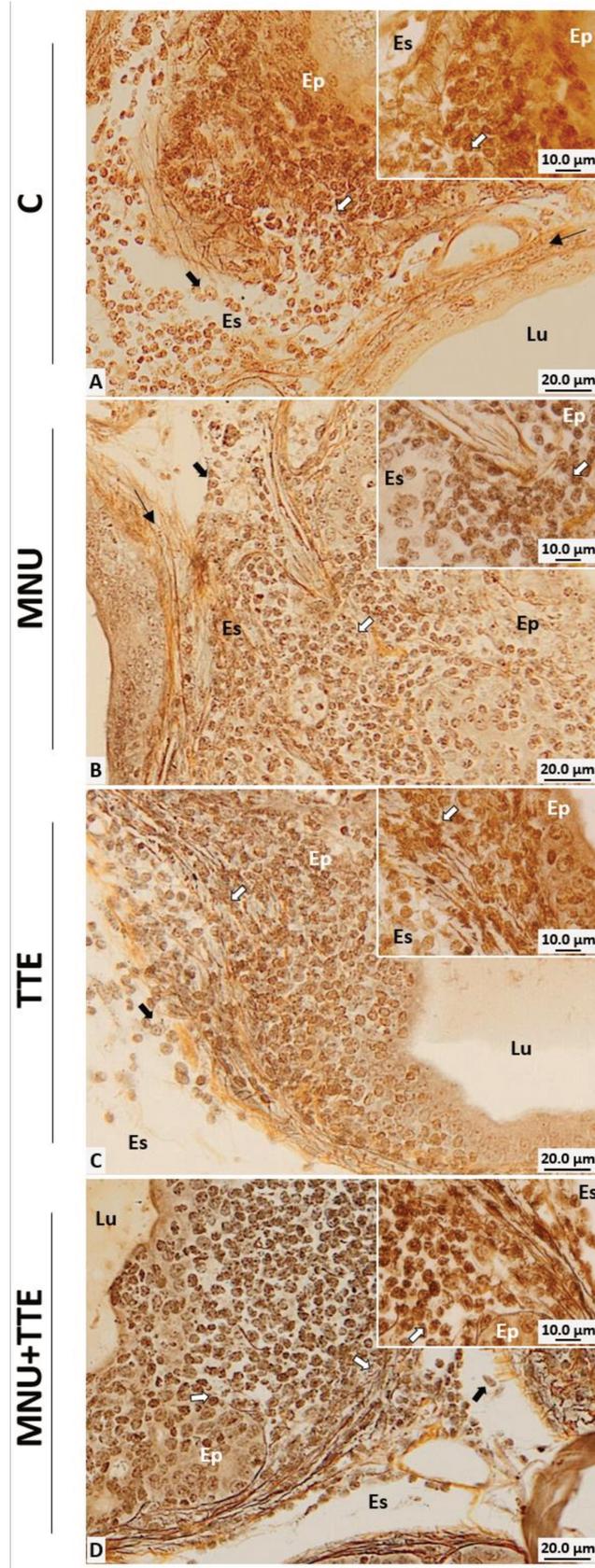


Figura 3

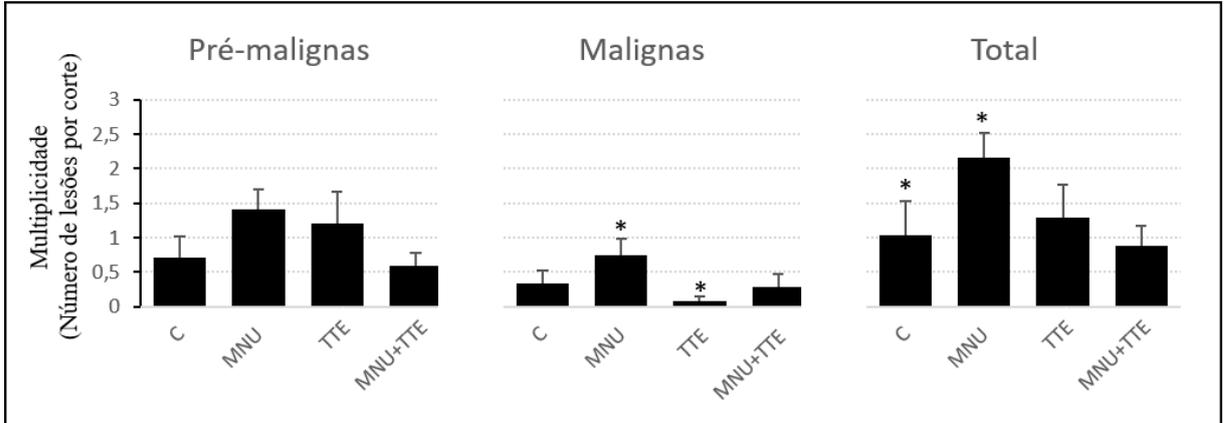


Figura 4

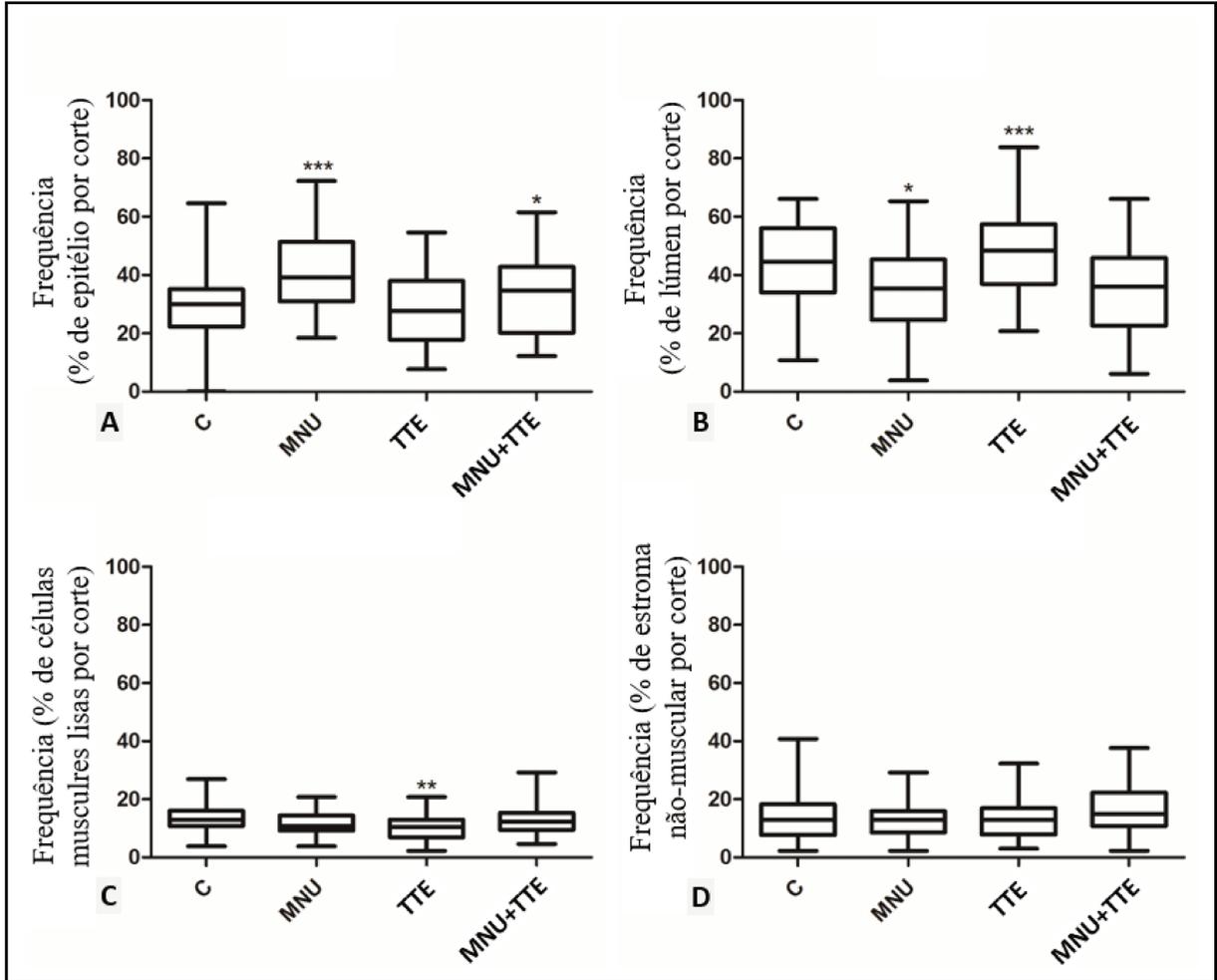


Figura 5

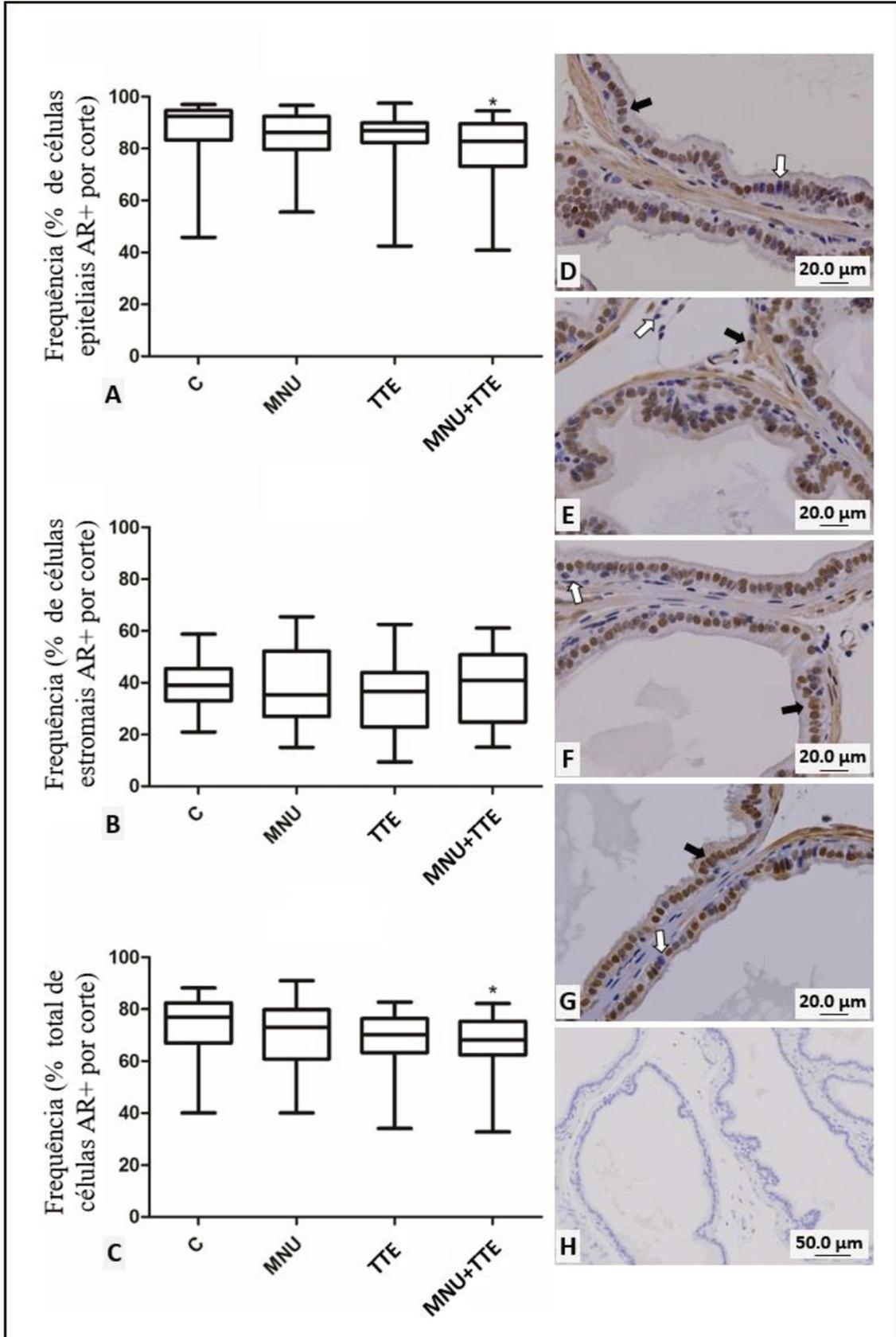


Figura 6

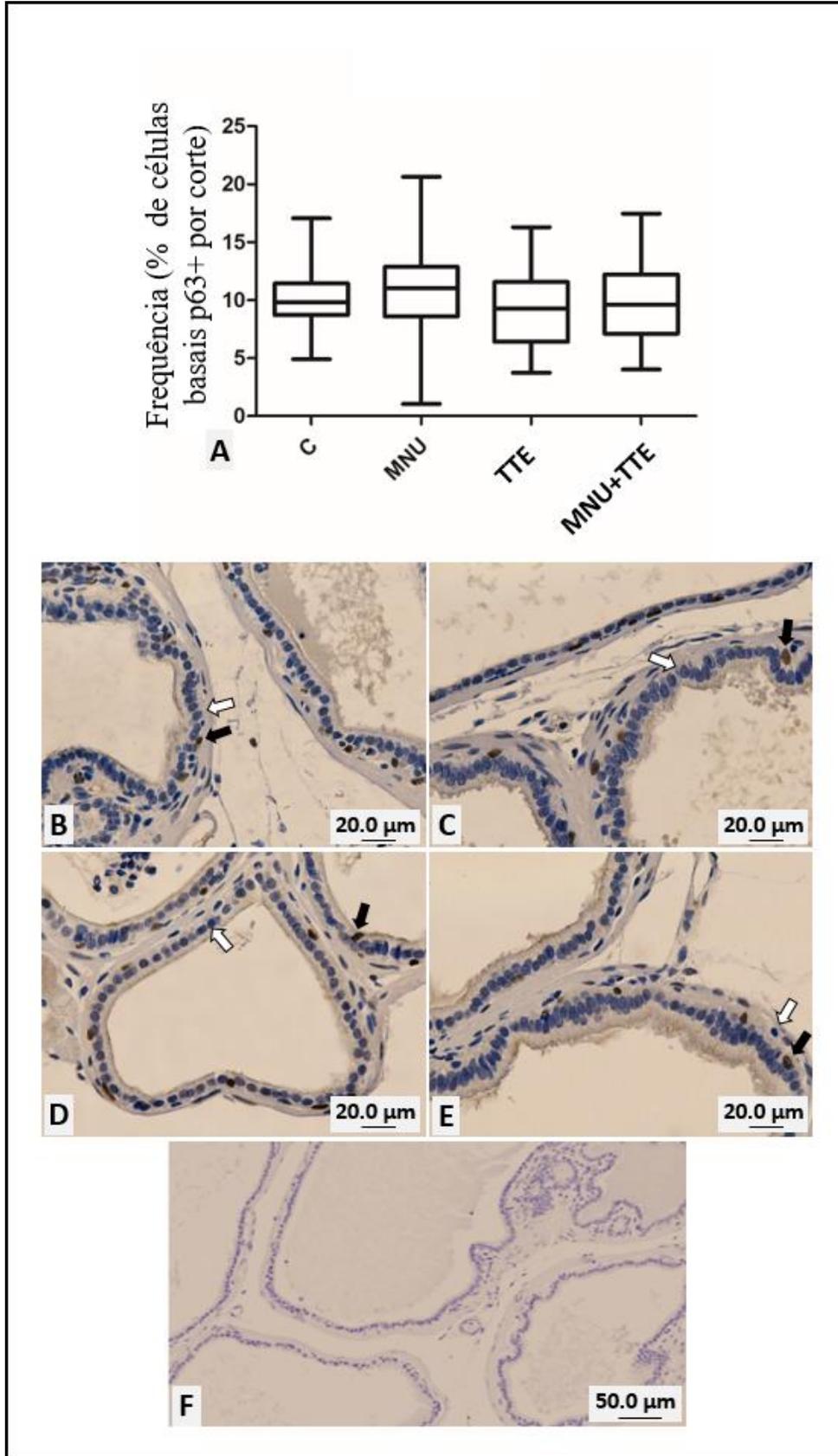


Figura 7

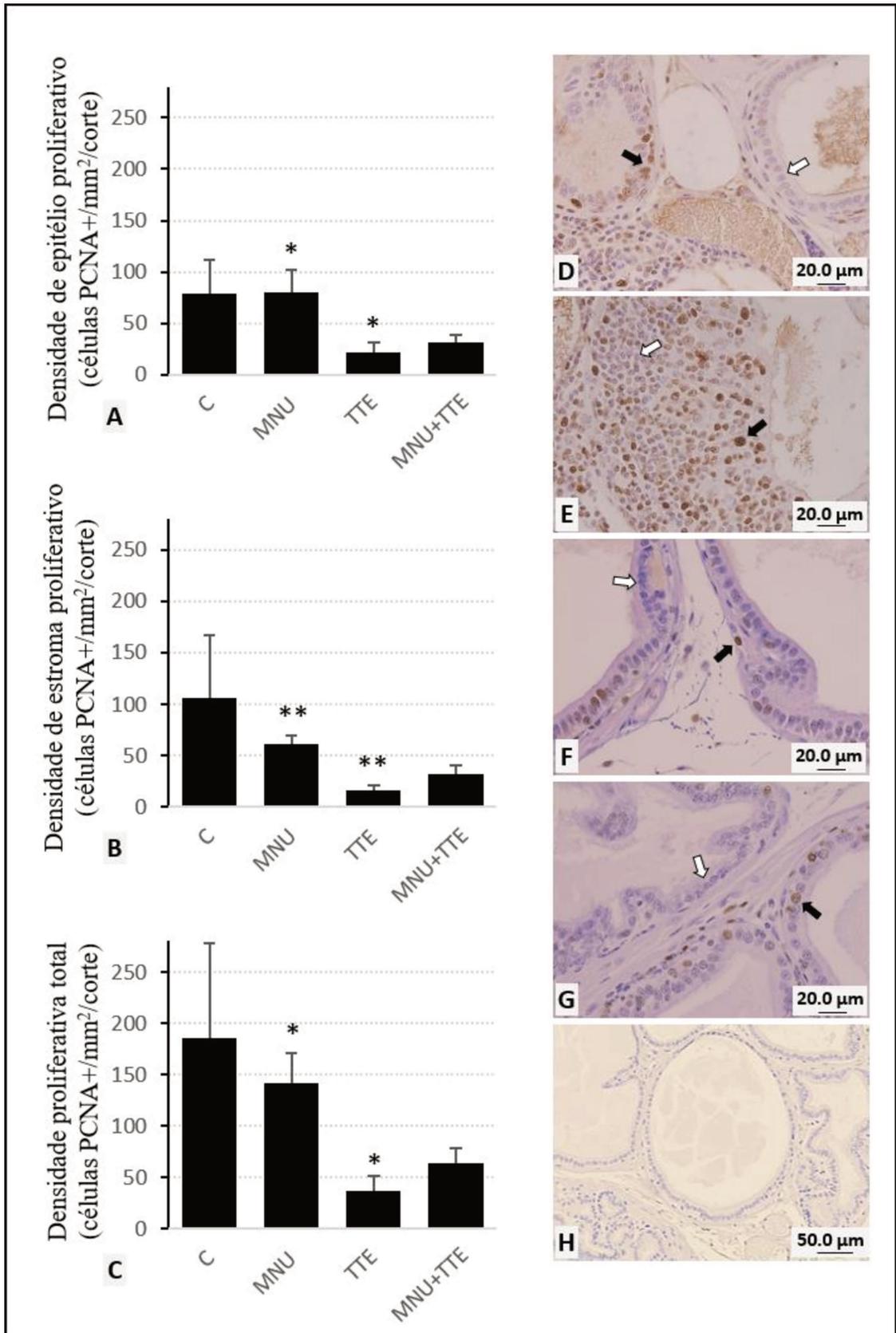
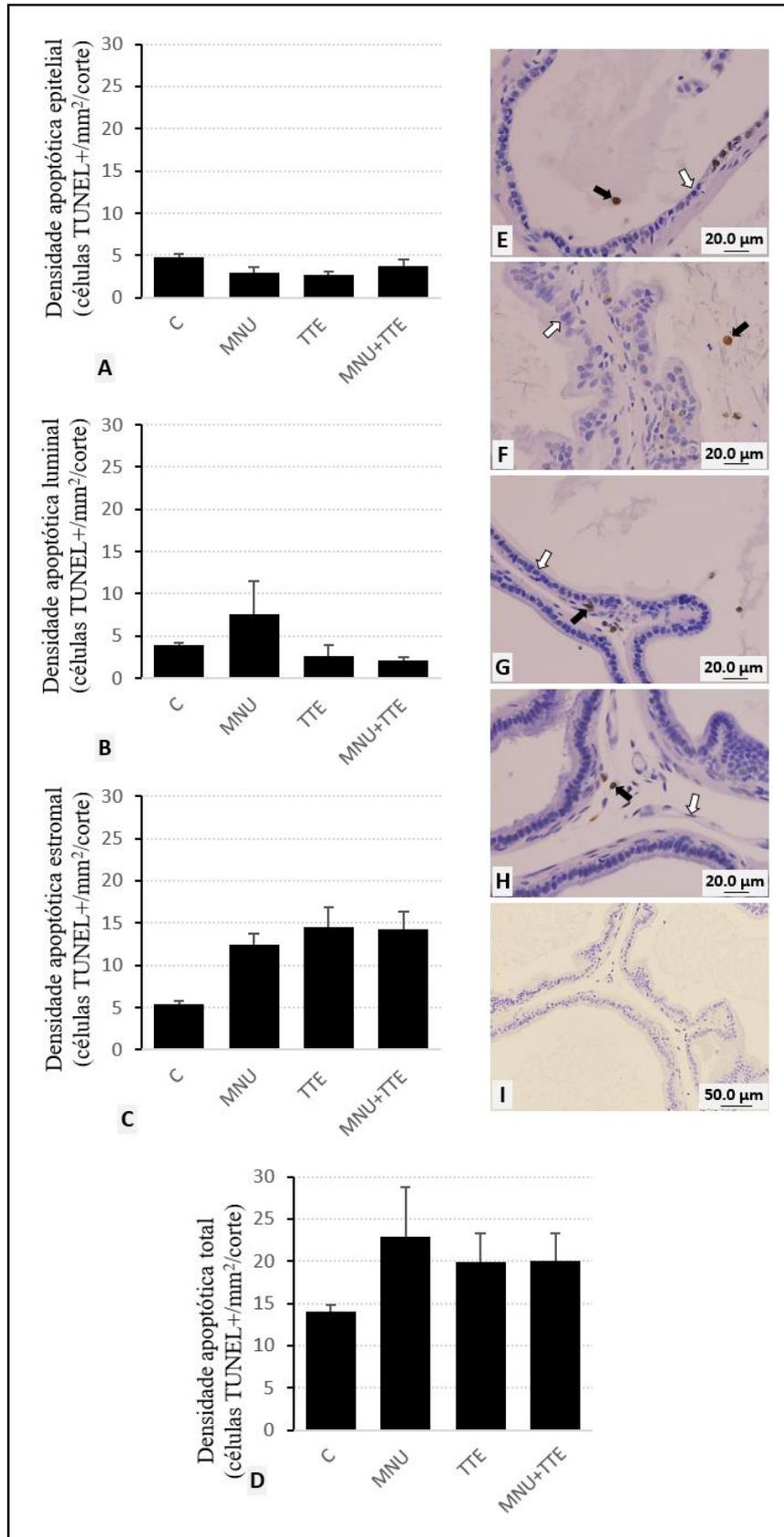


Figura 8



**Tabela**

Tabela 1

n = 6	Corpo			Complexo	LV	Testículo	Adrenal
	90 dias	180 dias	270 dias				
C	67,33 ± 2,23	72,00 ± 1,37	83,33 ± 5,65	0,62 ± 0,09	0,02 ± 0,004	0,60 ± 0,03	0,02 ± 0,002
MNU	67,33 ± 1,52	77,67 ± 3,70	83,00 ± 4,95	0,61 ± 0,03	0,02 ± 0,002	0,61 ± 0,02	0,02 ± 0,001
TTE	65,67 ± 1,41	76,33 ± 2,99	71,67 ± 5,71	0,65 ± 0,07	0,03 ± 0,004	0,52 ± 0,03	0,02 ± 0,001
MNU+TTE	67,67 ± 1,96	75,67 ± 6,01	73,67 ± 4,83	0,63 ± 0,08	0,02 ± 0,003	0,57 ± 0,03	0,02 ± 0,001

## 6 CAPÍTULO III

---

### **Efeitos do uso prolongado do fitoterápico *Tribulus terrestris* nos níveis de testosterona e na quimioproteção do lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia expostos ao carcinógeno N-metil-N-nitrosourea.**

Artigo a ser submetido à revista “**Journal of Dietary Supplements**”

#### **Informações sobre os autores:**

Diego Augusto Lopes da Silva<sup>1</sup>, Eloísa Zanin Pytlowanciv<sup>2</sup>, Silvana G Pegorin de Campos<sup>3</sup>, Bianca Facchim Golçalves<sup>4</sup>, Fernanda Cristina Alcântara dos Santos<sup>5</sup>, Sebastião Roberto Taboga<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Doutor, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. E-mail: diegolopes\_silva@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Doutora, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. E-mail: eloisa.zp@gmail.com

<sup>3</sup>Doutora, Professora Substituta do Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil. E-mail: spegorin@ibilce.unesp.br

<sup>4</sup>Doutora, pós-doutorado no Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. E-mail: bianca.fgoncalves@gmail.com

<sup>5</sup>Doutora, Professora do departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. E-mail: fernanda\_alcantara@ufg.br

<sup>6</sup>Doutor, Professor do Departamento de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto, Brasil. E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

#### **Autor correspondente:**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Laboratório de Microscopia e Microanálises, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

Tel. (17) 3221-2386; Fax (17) 3221-2390

**Contagem de palavras:**

Resumo – 293 palavras, 1856 caracteres com espaço

Texto – 4562 palavras, 29699 caracteres com espaço

Número de tabelas – 1

Número de figuras – 8

**Resumo**

A planta *Tribulus terrestris* (TT) se popularizou entre indivíduos de várias idades por sua suposta capacidade de elevar níveis séricos de testosterona. Além do uso tradicional no tratamento de disfunções sexuais, o fitoterápico tem sido usado por homens e mulheres como uma alternativa natural e legal para anabolizantes. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do uso prolongado do extrato de TT sobre os níveis de testosterona e as consequências de seu uso sobre a histofisiologia prostática do gerbilo da Mongólia, já que a glândula é andrógeno-sensível e pode responder a alterações no equilíbrio de hormônios sexuais. 24 machos da espécie *Meriones unguiculatus* foram divididos em quatro grupos: controle experimental, controle da indução carcinogênica (50 mg/kg de N-metil-N-nitrosourea – MNU – em dose única aos 180 dias), controle dos efeitos do uso prolongado do TT (11 mg/kg em doses diárias do 90° ao 270° dia) e tratamento prolongado associado à indução (11 mg/kg em doses diárias do extrato de TT do 90° ao 270° dia, com dose única de 50 mg/kg de MNU aos 180 dias). Os resultados indicam baixo potencial anabolizante na dose e período de tratamento administrados, já que o TT não foi capaz de elevar os níveis séricos de testosterona e não causou alterações biométricas em órgãos sensíveis a andrógenos. Além disso, o fitoterápico pode desempenhar papel quimioprotetor, retardando o surgimento de lesões malignas no lobo ventral da próstata. Parte dessa propriedade pode ser devido ao fato de o TT reduzir a atividade da via androgênica canônica (diminuição de receptores de andrógenos e de proliferação de células epiteliais) e elevar, parcialmente, a frequência de apoptose. No entanto, o TT não preveniu o surgimento de lesões pré-malignas e, em um dos grupos, parece ter contribuído para o aumento delas. Juntos, esses dados oferecem subsídios contrários ao potencial anabolizante do TT e indicam que novos estudos são necessários para avaliar a segurança do uso prolongado dessa substância, especialmente por indivíduos mais jovens.

**Palavras-chave:**

*Tribulus terrestris*, testosterona, MNU, câncer de próstata, quimioproteção.

## Introdução

O *Tribulus terrestris* (TT) é um fitoterápico rico em compostos biologicamente ativos, como alcaloides e glicosídeos, conhecido e utilizado há muito tempo em diversas medicinas tradicionais (CHHATRE et al., 2014). Trata-se de uma planta arbustiva anual, encontrada no Mediterrâneo, em regiões de clima desértico e subtropical, tida como uma colonizadora agressiva e globalmente distribuída, razão pela qual recebe diversos nomes regionais (ADAIKAN et al., 2001).

A planta é indicada para o tratamento de inúmeras moléstias, sendo a palição de disfunções sexuais um dos usos mais frequentemente encontrados nas diferentes culturas (UKANI et al., 1997; KOSTOVA & DINCHEV, 2005; CHHATRE et al., 2014). Inicialmente, atribuiu-se à planta um efeito afrodisíaco devido à sua capacidade de interferir no metabolismo de andrógenos, elevando os níveis séricos do hormônio luteinizante (LH), da deidroepiandrosterona (DHEA), da di-hidrotestosterona (DHT) e da testosterona propriamente dita (ADIMOELJA e ADAIKAN, 1997; GAUTHAMAN & ADAIKAN, 2005; GAUTHAMAN e GANESAN, 2008). Em tese, a protodioscina, uma saponina esteroidal com estrutura semelhante à da DHEA, foi creditada como o princípio ativo do fitoterápico, podendo ser encontrada em toda a planta, com maior concentração nas partes aéreas, especialmente nos frutos (MATHUR & SUNDARAMOORTHY, 2013).

Apesar de amplamente questionada na literatura, alguns experimentos realizados com humanos e animais corroboram a capacidade do TT em elevar os níveis de andrógenos (GAUTHAMAN e GANESAN, 2008; YIN et al., 2016; SALGADO et al., 2016). Por esta razão, o extrato herbal passou a ser utilizado também por praticantes de atividades físicas em busca de ganhos estéticos e de desempenho, com base no ganho de testosterona a partir de uma alternativa natural e legal aos anabolizantes (ANTONIO et al., 2000; BROWN et al., 2000; MASON et al., 2001; ROGERSON et al., 2007).

Assim, a planta que antes era indicada para manutenção do equilíbrio hormonal para homens em idade avançada, passou a ser utilizada por homens e mulheres de diferentes idades e por tempo indeterminado. Isto porque o uso de produtos naturais cresce em todo o mundo, encorajado pelo fácil acesso, o baixo custo, o apelo histórico e cultural e pela crença de que os produtos naturais não oferecem riscos à saúde (MALVIYA et al., 2011).

No entanto, esta segurança é questionável, pois o uso dessas substâncias é baseado em conhecimentos populares e raramente são estudados experimentalmente, de forma que a atuação dos compostos envolvidos não é clara (QURESHI et al., 2014). Além disso, por não serem considerados como medicamentos, negligencia-se a fiscalização de sua qualidade e

eficácia biomédica, o que gera riscos, já que essas substâncias podem não ser funcionais de fato ou, o que é mais perigoso, podem trazer efeitos nocivos à saúde, assim como substâncias sintéticas (POKRYWKA et al., 2014)

A respeito da próstata, que é um órgão alvo da ação de andrógenos, o risco oferecido pelo consumo do TT reside na possibilidade de interferência na homeostasia prostática, caso o extrato seja realmente capaz de alterar o perfil hormonal. Isto porque a manutenção da histoarquitetura e da fisiologia da glândula está intimamente relacionada com os níveis de hormônios sexuais (TAPLIN & HO, 2001), e altos níveis de testosterona podem influenciar a instalação e a progressão de tumores prostáticos (BOSLAND, 2014).

Por outro lado, há indícios de que o TT não seja eficaz em elevar os níveis de testosterona (NEYCHEV & MITEV, 2005; KUMARI & SINGH, 2015; ROAIAH et al., 2016). Além disso, o extrato poderia atuar como agente quimioprotetor, auxiliando no combate à instalação e progressão tumoral. Saponinas presentes em extratos do TT foram capazes de inibir a indução de câncer em culturas de células hepáticas (KIM et al., 2011) e de queratinócitos expostos à radiação UVB (SISTO et al., 2012). A terrestrosina D mostrou atividade antitumoral e antiangiogênica ao interromper o ciclo celular e induzir a apoptose em células de câncer prostático e endoteliais tanto *in vitro* quanto *in vivo* em implantes xenográficos de células da linhagem PC-3 (WEI et al., 2014).

Dessa forma, a dualidade ligada ao uso da planta lança dúvida sobre a segurança de seu consumo e sobre os possíveis efeitos do TT sobre os órgãos endócrino-responsivos. Por esta razão, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade do TT em alterar os níveis séricos de testosterona e os efeitos dessa possível alteração sobre a histofisiologia prostática. Além disso, buscamos avaliar o seu potencial quimioprotetor ou carcinogênico quando associado à N-metil-N-nitrosourea (MNU), que é um potente agente carcinogênico que promove metilação direta de macromoléculas, inclusive proteínas e DNA (KAINA et al., 2007). A MNU tem sido muito utilizada em protocolos que testam meios de quimioprevenção ou agentes promocionais de tumores (BOSLAND, 1999). Em roedores o protocolo de associação entre MNU e testosterona mostrou que este hormônio pode desempenhar a função de gatilho para a instalação e progressão de tumores decorrentes da exposição ao carcinógeno (BOSLAND, 2014; GONÇALVES et al., 2010 e 2013). Com isso, este estudo pretende oferecer subsídios experimentais para os questionamentos referentes ao potencial androgênico do fitoterápico, bem como à segurança de seu consumo em relação à saúde prostática.

## **Material e Métodos**

### ***Animais e delineamento experimental***

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados 24 gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). Todos os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/Unesp), sob condições de luminosidade e temperatura adequadas, e alimentação e água *ad libitum*, de acordo com as normas internas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Unesp e do COBEA (nº Proc.: 54/2011 – CEUA, anexo 11.2, página 174).

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, cada um com seis indivíduos (apêndice 10.1.2, página 171). As datas de início dos experimentos coincidiram com a entrada dos animais na fase adulta (90 dias), quando os níveis hormonais séricos se encontram estabilizados. No grupo controle experimental (C), os animais não sofreram qualquer intervenção; no grupo que representa o controle da indução carcinogênica (MNU), os animais receberam uma dose única de MNU no 180º dia e não sofreram nenhuma outra intervenção; no grupo controle dos efeitos do uso prolongado do fitoterápico (TTE), os animais receberam doses diárias do extrato a partir do 90º dia até o 270º dia (180 dias); no grupo em que se analisa o tratamento prolongado associado à indução (MNU+TTE), os animais receberam doses diárias do extrato a partir do 90º dia até o 270º dia (180 dias), com uma dose única de MNU no 180º dia (isto é, exatamente na metade do tratamento com o extrato de TT).

### ***Drogas e dosagens***

A administração de MNU se deu por injeção intraperitoneal em dose única (0,25 ml; 50 mg/kg) do carcinógeno N-metil-N-nitrosourea (CAS 684-93-5; Sigma, St. Louis, MO). A droga foi pré-diluída em tampão citrato de sódio com pH 6,0 (modificado de GONÇALVES et al., 2010) no momento do uso. O extrato de TT, produzido a partir da maceração do fruto seco, é de origem chinesa e foi adquirido em farmácia de manipulação (lote LXCJ120503#5). O grau de pureza é de 45% (48,24 % de saponinas, segundo laudo de controle de qualidade, anexo 11.1, página 173). A administração diária do extrato foi feita por gavagem (0,5 ml; 11 mg/kg), após o fitoterápico ter sido suspenso em água destilada no momento do uso (MARTINO-ANDRADE et al., 2010). A opção pelo uso do extrato seco e não do componente ativo purificado simula o uso costumeiro desse fitoterápico e a dose utilizada é compatível com a dose aplicada a humanos.

### ***Biometria e morte***

Os gerbilos foram pesados aos 90, 180 e 270 dias para análise da alteração da massa corporal e foram mortos no 270º dia, com nove meses de idade. Todos foram submetidos à inalação de CO<sub>2</sub> e, depois de pesados, foram decapitados para a coleta do sangue, que foi submetido à dosagem hormonal. Foram removidos e pesados os complexos prostáticos (próstata + vesícula seminal + uretra prostática), os testículos e as adrenais. Os lobos ventrais das próstatas foram isolados, devidamente pesados e fixados de acordo com a metodologia adequada para cada uma das análises.

### ***Dosagem hormonal***

As amostras de sangue foram coletadas logo após a decapitação em tubos de ensaio de 4 ml com gel de separação. O material foi centrifugado durante 20 minutos, a 3.000 rpm, e o soro separado e congelado em *biofreezer* a -80°C para posterior análise dos níveis de testosterona. A análise foi feita por ELISA, utilizando-se o kit comercial específico (Testosterone EIA Kit, número no catálogo 582701, Cayman Chemical Company, MI) de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante, utilizando-se de 50 µl de cada amostra previamente congelada, diluída em 10 vezes. O limite de detecção para a testosterona foi de 6 pg/ml. As leituras foram feitas com o equipamento Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, VT, USA).

### ***Obtenção de cortes histológicos***

Os lobos ventrais coletados e destinados à análise morfológica foram fixados por imersão. Três deles foram imersos em paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato (0,2M, pH 7,2) durante 24 horas, e três foram imersos em metacarn (metanol, clorofórmio e ácido acético, 6: 3: 1) durante três horas. Em seguida, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído em parafina (Histosec - MERK). Os blocos de parafina contendo o material para análise foram seccionados em micrótomo rotativo, produzindo cortes de 5 µm, coletados em lâminas de vidro silanizadas para as devidas colorações.

### ***Análise morfológica***

Para avaliar as diferenças morfológicas nos diferentes grupos experimentais, cortes histológicos foram submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina (HE) e Reticulina de Gömori, as quais permitiram analisar a estrutura glandular, fazer quantificações celulares e de lesões

(MELLO & VIDAL, 1980). As avaliações foram feitas em microscopia de luz e as imagens histológicas foram digitalizadas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens - Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics, ou digitalizadas a partir do scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI) e ao sistema analisador de imagens Olympus OlyVIA 2.9 (Build 13735) ©Olympus Soft Imaging Solutions GmbH.

### ***Análise estereológica***

A análise estereológica foi realizada para a obtenção da frequência relativa dos diferentes compartimentos prostáticos (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não-muscular) dos grupos em estudo. Para isso, foram capturados 48 campos aleatórios por grupo, divididos igualmente entre os seis animais de cada grupo (8 campos por animal), a partir de lâminas coradas pela HE, através do scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI), no aumento de 200x. As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1978). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, obteve-se a frequência relativa (porcentagem) dos compartimentos prostáticos. Para o cálculo de frequência relativa dos compartimentos utilizaram-se os pontos do Sistema-teste que coincidiam com cada compartimento e esses números de pontos foram transformados em porcentagem.

### ***Contagem de lesões***

Para fazer a quantificação de lesões neoplásicas, foram separadas quatro lâminas de cada animal, contendo cortes de diferentes profundidades do material incluído (90 µm de distância entre cada ponto). Com isso, em cada grupo experimental foram utilizadas 24 imagens de cortes corados em HE e digitalizados com scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI) no aumento de 200x. A partir de uma varredura de toda a extensão dessas seções com o sistema analisador de imagens Olympus OlyVIA 2.9 (Build 13735) ©Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, foram contados os focos de lesões neoplásicas. Cortes adjacentes àqueles em que foram detectadas lesões proliferativas foram então submetidos à técnica da Reticulina de Gömori, de forma que foi possível classificar as lesões em pré-malignas, quando elas eram restritas ao compartimento epitelial e acinar, ou malignas, quando foi observado o rompimento da membrana basal dos ácinos glandulares e a invasão das células proliferativas para outros compartimentos prostáticos. A partir do número obtido, foi calculada

a multiplicidade de lesões pré-malignas e malignas em cada grupo experimental (média de cada tipo de lesão por corte).

### *Análise imunoistoquímica*

Foram realizadas reações imunoistoquímicas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em cortes previamente fixados em metacarn e para o receptor de andrógeno (AR) e marcador de células basais (p63) em cortes histológicos da próstata previamente fixados em paraformaldeído tamponado. Resumidamente, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (10 mM, pH 6,0) a 98°C por 50 min. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi feito através da incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 20 min, seguido de permeabilização em Triton 0,2% por 15 min. O bloqueio das interações proteicas inespecíficas foi realizado em leite 5% em TBS por 30 min em temperatura ambiente. Em sequência os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-PCNA (1:100, mouse monoclonal, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluído em BSA1%, durante 1 h a 37°C, ou anti-AR (1:75, rabbit policlonal, sc816, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-p63 (1:100. Mouse monoclonal, 4A4: sc-8431, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) overnight a 4°C. Após serem lavados em TBS (acrescido de NP40 para o AR) a interação antígeno-anticorpo para o PCNA e para a p63 foi detectada usando o kit Max Polymer (Novocastra, RE7260-K, Leica Biosystems) por 30 min cada etapa ou para o AR os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotilado anti-rabbit e então imersos em complexo avidina/biotina (Rabbit ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA) por 45 min a 37°C. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina-DAB (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako, K3468) e a contracoloração foi realizada em hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido com a omissão do anticorpo primário.

A contagem das células PCNA-positivas foi realizada nos compartimentos epitelial e estromal em toda a extensão do fragmento e o total foi dividido pela área do corte, obtendo-se, assim, a densidade de células em proliferação nos dois compartimentos (células positivas por mm<sup>2</sup>). Para isso, toda a extensão do corte em três profundidades diferentes (cerca de 60 µm de distância) do mesmo LV foi digitalizada em scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI) no aumento de 200x.

A frequência relativa de células AR-positivas e de células basais p63-positivas foi estimada através do total de células marcadas e não marcadas no epitélio e estroma no caso do AR e epitélio no caso da p63 a partir de 10 imagens contíguas, digitalizados no aumento de

400x. Ambas as contagens foram feitas com o auxílio do programa Image Pro Plus Media Cybernetics version 4.5 for Windows (MD, USA) em 3 animais por grupo, com um n amostral de 4693 - 6198 células por grupo experimental na análise do AR total e 2676 – 3907 células por grupo experimental na análise da p63.

### ***Detecção de células apoptóticas***

A identificação das células apoptóticas foi efetuada com base na reação de TUNEL-Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TdT-Fragel- Calbiochem, CN Biosciences, La Jolla, CA, USA). Essa foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Após digestão enzimática com Proteinase K, os cortes foram tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 5 min, para o bloqueio da atividade de peroxidase endógena. Seguiu-se a incubação com a enzima deoxinucleotidil terminal transferase (TdT, 1:20) durante 1 hora para a detecção dos fragmentos de cromatina que se formam durante a apoptose. Ao final da reação, os nucleotídeos biotinilados foram reconhecidos por estreptoavidina conjugada com peroxidase e revelados com diaminobenzidina por 5 minutos (0,07%). Os cortes foram contracorados com hematoxilina. A densidade das células apoptóticas foi obtida da mesma maneira que a contagem das células PCNA-positivas, nos compartimentos epitelial, luminal (células liberadas no lúmen) e estromal em toda a extensão do corte.

### ***Análise estatística***

Os parâmetros quantitativos do trabalho foram avaliados estatisticamente pelo software Statistica 7.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2004, Tulsa, OK, USA). Os dados foram testados considerando os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os grupos que assumiram esses pressupostos (dados paramétricos) foram comparados aplicando teste de one-way ANOVA seguido de Tukey (post hoc). Os dados que não se enquadraram nesses pressupostos (dados não paramétricos) foram comparados aplicando o teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (post hoc). Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### ***As intervenções não causaram alterações nos dados biométricos***

Considerando-se cada momento de mensuração da massa corporal (90, 180 e 270 dias), não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (tabela 1). O mesmo se

diz da massa do complexo prostático ou do lobo ventral da próstata isolado, das adrenais e dos testículos. De maneira geral, os animais do mesmo grupo experimental apresentaram uma tendência de ganho de massa corporal com o passar dos meses.

#### ***O uso prolongado de TT não alterou os níveis séricos de testosterona***

Apesar dos grupos TTE ( $1,36 \text{ ng/ml} \pm 0,15$ ; média  $\pm$  EP) e MNU+TTE ( $1,72 \pm 0,14$ ) terem apresentado um leve aumento nos níveis séricos de testosterona em relação ao grupo C ( $1,05 \pm 0,19$ ), todos eles ficaram abaixo dos níveis apresentados pelo grupo MNU ( $1,92 \pm 0,47$ ), que não recebeu doses do extrato. No entanto, a intervenção não causou alterações estatisticamente relevantes nos níveis séricos de testosterona em nenhuma das situações experimentais ( $p = 0,0743$ ).

#### ***TT inibe alterações morfológicas causadas pela exposição ao carcinógeno MNU***

Os tratamentos utilizados provocaram alterações na morfologia usual do lobo ventral da próstata do gerbilo. Além das alterações comuns para a idade dos animais estudados, como hiperplasias, metaplasias, arcos intra-epiteliais e focos inflamatórios periductais e intraluminais (figura 1), foi possível observar também lesões microinvasivas. Estas se caracterizaram pela ruptura da região da membrana basal e extravasamento de células epiteliais no estroma subjacente, o que pode ser evidenciado pela fragmentação de fibras reticulares (figura 2).

A análise quantitativa da multiplicidade de lesões neoplásicas (figura 3) mostrou o aumento mais expressivo no grupo MNU ( $2,17 \pm 0,36$ ). Este aumento foi significativo em relação aos grupos C e MNU+TTE ( $1,04 \pm 0,49$  e  $1,5 \pm 0,63$ , respectivamente). O uso do extrato sozinho não provocou aumento significativo do número de lesões no grupo TTE ( $2,17 \pm 0,74$ ). Em se considerando apenas as lesões pré-malignas, não há diferenças significantes entre os grupos analisados, embora tenha-se notado certo aumento na multiplicidade dessas lesões no grupo TTE ( $2,04 \pm 0,65$ ) em relação aos outros grupos ( $0,71 \pm 0,31$  para C,  $1,41 \pm 0,29$  para MNU e  $1,46 \pm 0,62$  para MNU+TTE). O grupo MNU apresentou um número maior de lesões malignas quando comparado com o grupo MNU+TTE ( $0,75 \pm 0,23$  e  $0,04 \pm 0,04$ , respectivamente).

A análise estereológica indica um aumento de 41,4% na frequência do compartimento epitelial no grupo MNU ( $40,91 \pm 1,96$ ) em relação ao grupo C ( $28,93 \pm 1,54$ ), de 19,3% em relação ao grupo TTE ( $34,28 \pm 1,86$ ) e de 21,1 % em relação ao grupo MNU+TTE ( $33,78 \pm 1,65$ ) (figura 4). O lúmen acinar do grupo MNU diminuiu significativamente em

frequência em relação ao grupo C ( $34,31 \pm 2,20$  e  $43,73 \pm 1,91$ , respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos no que diz respeito à frequência dos compartimentos estromais muscular e não-muscular.

#### ***TT reduz a frequência de células AR-positivas e de células basais (p63-positivas)***

A frequência de células AR-positivas foi reduzida com o uso do fitoterápico tanto no compartimento epitelial, quanto no estromal (figura 5). Em se considerando apenas o compartimento epitelial, os dados são significativamente menores no grupo TTE ( $68,93 \pm 2,59$ ) em relação aos outros três grupos. No estroma, o grupo MNU+TTE ( $24,98 \pm 2,81$ ) apresentou uma redução significativa em relação aos grupos C e MNU ( $39,04 \pm 1,63$  e  $38,05 \pm 2,73$ , respectivamente). A imunorreatividade total indica uma redução nas células AR-positivas do grupo MNU+TTE ( $55,54 \pm 2,67$ ) em relação aos outros três grupos.

A frequência de células basais, marcadas positivamente para a p63, foi significativamente menor apenas no grupo TTE ( $7,95 \pm 0,35$ ) quando comparado aos três outros grupos (figura 6).

#### ***TT inibe a proliferação celular apresenta tendência em elevar a densidade de células apoptóticas***

A densidade de células epiteliais PCNA-positivas (figura 7) indicaram uma significativa ação antiproliferativa do TT no grupo MNU+TTE quando comparado com o grupo MNU ( $21,02 \pm 6,17$  e  $80,09 \pm 21,56$ , respectivamente), o mesmo ocorrendo quanto à densidade de células estromais PCNA-positivas (MNU+TTE  $12,47 \pm 2,01$  e MNU  $61,01 \pm 9,02$ ). A imunorreatividade total corrobora o observado nos dois compartimentos, com diferenças estatísticas entre MNU+TTE ( $33,49 \pm 8,01$ ) e MNU ( $141,20 \pm 29,98$ ). Apesar de a taxa de apoptose não ter sofrido nenhuma alteração estatisticamente relevante entre os grupos no que diz respeito ao epitélio, ao lúmen ou ao estroma, existe uma tendência de aumento dos eventos de morte celular programada em todos os grupos em relação ao C quando se considera a soma de todos os compartimentos (figura 8).

### **Discussão**

Desde o início do uso comercial do TT, o fitoterápico tem sido relacionado com a melhora do desempenho sexual por supostamente interferir no metabolismo de andrógenos, elevando os níveis de LH, DHT, DHEA e testosterona (CHHATRE et al., 2014). Por conta desse suposto efeito anabolizante, o TT passou a ser usado com outras finalidades, como o

ganho em disposição e de massa muscular para fins esportivos ou estéticos (ANTONIO et al., 2000).

No entanto, esta afirmação não encontra muito apoio na literatura. Diversos trabalhos mostram que, apesar de o TT apresentar, de fato, algum efeito positivo na biologia reprodutiva, sua ação pode não estar relacionada com o aumento dos níveis de andrógenos (SANSALONE et al., 2014 e 2016; SALGADO et al., 2016). Uma das possibilidades que justificam o efeito do TT no desempenho sexual é sua atuação no metabolismo do óxido nítrico (ON) de forma independente de andrógenos: o fitoterápico seria capaz de estimular a atividade da enzima óxido nítrico sintase, aumentando a liberação de ON e, conseqüentemente, facilitando o relaxamento do tecido muscular no corpo cavernoso e o aumento da pressão intracavernosa, culminando na melhora da ereção (KAM et al., 2012; DO et al., 2013).

Assim, apesar do ganho no desempenho sexual, não faria sentido a utilização do extrato como alternativa para anabolizantes. Um experimento realizado com machos e fêmeas de ratos Wistar, o TT não causou mudanças significantes nos níveis de testosterona e não produziu efeito estimulatório em órgãos endócrino-sensíveis, como a próstata, vesícula seminal, útero ou vagina (MARTINO-ANDRADE, 2010). Dados semelhantes foram mostrados em um trabalho prévio da nossa equipe, em que o TT não foi capaz de elevar a testosterona nem causar alterações biométricas em órgãos andrógeno-responsivos quando utilizado por 3 meses em gerbilos (Capítulo II). Tampouco desempenha efeito anabolizante o uso prolongado do TT, por seis meses, como demonstrado por este estudo.

A bula do medicamento Androsten®, nome comercial do extrato de TT no Brasil, diz que o medicamento é eficiente em manter o equilíbrio hormonal (ANDROSTEN®, 2013). Os compostos biologicamente ativos do fitoterápico tem demonstrado capacidade de atuar como agentes antioxidantes, protegendo os tecidos relacionados com a reprodução, como os testículos, dos efeitos deletérios do envelhecimento ou da exposição a substâncias podem interferir no bom funcionamento desses órgãos (SHARMA et al., 2013; KUMARI & SINGH, 2015; SAHIN et al., 2016). Assim, justifica-se a possibilidade de o TT atuar na conservação do equilíbrio hormonal, ao auxiliar na manutenção da integridade dos tecidos com função endócrina, mas não desempenhar, de fato, o papel de promotor da secreção de testosterona ou outros andrógenos.

Tendo sido descartada, portanto, a hipótese de que o TT pudesse trazer riscos para a saúde prostática devido ao aumento da concentração de testosterona, apontada como um potente agente carcinogênico para a próstata (BOSLAND, 2014), nós buscamos avaliar o potencial quimioprotetor do fitoterápico contra o câncer de próstata induzido por MNU. O

modelo de indução tumoral utilizando a combinação de MNU e testosterona indica que esse hormônio pode funcionar como um gatilho para a instalação tumoral, antecipando o surgimento de lesões malignas no lobo ventral da próstata do gerbilo, (GONÇALVES et al., 2010 e 2013). O presente trabalho mostrou que, sozinho, o TT não foi capaz de evitar o surgimento de lesões pré-malignas, mas, quando administrado juntamente com a MNU, o extrato reduziu, significativamente, a multiplicidade de lesões malignas. Esses dados reiteram a falta de potencial androgênico do fitoterápico, enquanto reforça a possibilidade de sua ação quimioprotetora em relação às lesões malignas, mas não em relação às lesões pré-malignas.

O TT não interfere na cinética de proliferação das células epiteliais luminiais, quando comparada com o grupo controle, mas inibe a proliferação desencadeada pela MNU. Indícios da capacidade antiproliferativa do TT foram relatados em ensaios realizados com cultura melanócitos (DENG et al., 2002) e de células de câncer mamário da linhagem Bcap-37 (SUN et al., 2003). Nossos resultados sugerem que o mesmo efeito pode ser observado *in vivo*. O TT também demonstrou efeito protetor *in vivo*, contra o câncer de pele induzido por 7,12 - dimetilbenzantraceno (DMBA) em camundongos (KUMAR et al., 2006). Embora alguns autores tenham sugerido que as saponinas atuem como indutoras de apoptose (SUN et al., 2004; YANG et al., 2005), essa tendência não foi estatisticamente confirmada no nosso estudo. No entanto, a marcação pela reação de TUNEL indica forte tendência de aumento nos eventos de apoptose quando consideramos a densidade total de células apoptóticas. Dessa forma, ao inibir a proliferação e estimular a apoptose, o TT pode contribuir para o controle da progressão das lesões observadas nos cortes histológicos analisados, ainda que não tenha evitado que elas fossem iniciadas.

Em relação à frequência de células p63-positivas, o grupo TTE apresentou um número significativamente menor que todos os outros grupos. A literatura diz que lesões em estágios avançados e que apresentam caráter bastante indiferenciado entre as células, apresentam redução do número de células basais (MONTIRONI et al., 1996). É interessante observar que, embora sem diferença estatística, este grupo apresentou elevada multiplicidade de lesões pré-malignas. No entanto, essas lesões não avançaram para estágios mais severos, o que pode sugerir que o TT seja capaz de deter a invasividade tumoral, além do potencial antiproliferativo, como já demonstrado na literatura (KUMAR et al., 2006; KIM et al., 2011).

De fato, entende-se que a progressão tumoral na próstata é um evento multifatorial que envolve a transformação de células normais que passam a exibir maior potencial de crescimento, mobilidade e invasividade que culminam na metástase. Todo esse processo depende não somente da transformação que ocorre nas células epiteliais, mas também da

modificação do microambiente glandular durante a transição epitélio mesenquimal, com intensa modificação das células e componentes do estroma (GONÇALVES et al., 2015). A diosgenina, uma das saponinas esteroidais presentes no extrato de TT, mostrou ser eficiente na inibição da migração e invasividade de células da linhagem PC-3 por reduzir a expressão de metaloproteinasas e outros componentes envolvidos na remodelação da matriz extracelular e na resposta ao estresse (CHEN et al., 2011). Dados como esse podem ajudar a explicar como o tratamento aplicado neste estudo colaborou para a redução da multiplicidade de lesões malignas, ainda que alguns grupos tenham apresentado alto número de neoplasias intra-epiteliais.

Assim como no tratamento em curto prazo (Capítulo II), a diminuição da frequência do AR indica que, além de não contribuir para o aumento dos níveis de testosterona, o uso prolongado do TT também pode ter efeito antiandrogênico. Há escassez de dados a esse respeito, embora alguns estudos realizados com fêmeas portadoras da síndrome do ovário policístico (SOP), uma desordem caracterizada pela resposta fisiológica excessiva aos andrógenos, corroborem essa possibilidade. O uso do TT desempenhou ação luteinizante, reduzindo o número de cistos e retomando a atividade ovariana em fêmeas de ratos Wistar, atenuando, portanto, os sintomas da SOP (DEHGHAN et al., 2012). O TT também mostrou atividade antiandrogênica *in vitro* e foi capaz de atenuar os sintomas da SOP em fêmeas de ratos Sprague-Dawley, reduzindo o nível de testosterona, inibindo a atividade transcricional do AR (SANDEEP et al., 2015). No gerbilo constatou-se resposta semelhante uma vez que houve uma ação específica do TT em reduzir a atividade da via androgênica canônica, caracterizada pela redução de células AR positivas e diminuição da proliferação de células epiteliais.

Tomados juntos, esses dados oferecem subsídios em defesa de que o consumo prolongado de TT não oferece riscos à histofisiologia prostática relacionados com o metabolismo de andrógenos *in vivo*. Ao contrário, a análise morfológica desempenhada neste trabalho indica que o consumo do extrato seco da planta pode ter potencial quimioprotetor, como já sugerido em experimentos realizados com células em cultura. O tratamento com TT em animais propensos ao desenvolvimento do câncer prostático pode minimizar a incidência de lesões malignas com o envelhecimento. No entanto, ainda não ficou clara a relação entre o TT e a incidência de lesões pré-malignas: se o extrato não causa aumento na concentração de testosterona, por que causaria tantos processos proliferativos como os observados no grupo TTE? Uma das possibilidades que apontamos é a de que o TT, quando utilizado em indivíduos jovens (neste experimento os animais começaram o tratamento com o TT aos 90 dias, que coincide com a idade de plena produção hormonal), o TT possa atuar sinergicamente,

aumentando a resposta à testosterona. Isso explicaria a possibilidade de o TT ter um papel de gatilho para a instalação de lesões pré-malignas quando aplicado em indivíduos jovens e também corroboraria os possíveis efeitos anabolizantes relacionados ao seu uso, apesar de não elevar os níveis de testosterona.

Para responder a essas novas questões, nosso grupo de pesquisa planeja desenvolver, a seguir, estudos moleculares que visam entender melhor os mecanismos pelos quais o TT pode atuar na quimioproteção da próstata *in vivo*, especialmente aqueles envolvidos com a redução da atividade de remodelação do estroma e diminuição da invasividade de lesões. Além disso, pretendemos estudar a influência do uso de TT em animais mais jovens, a fim de compreender se de fato, e de que forma, o TT pode contribuir com a instalação de lesões pré-malignas na próstata de gerbilos.

### **Conclusão**

Nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho, o consumo prolongado por seis meses do TT não foi capaz de provocar a elevação dos níveis de testosterona e não alterou parâmetros biométricos de órgãos andrógeno-sensíveis do gerbilo da Mongólia, o que permite inferir que o fitoterápico não apresenta efeito anabolizante neste modelo experimental. Além disso, a combinação de TT com o carcinógeno MNU não antecipou a instalação de lesões malignas no lobo ventral da próstata. Ao contrário, o extrato mostrou efeito quimioprotetor, reduzindo o número de lesões totais, especialmente as lesões malignas, quando comparado com o grupo controle da indução (grupo MNU), reduzindo a densidade de células em proliferação e a frequência de células AR-positivas. No entanto, o TT não foi plenamente capaz de prevenir a instalação de lesões pré-malignas, podendo inclusive ter contribuído para o seu aumento em um dos grupos experimentais (grupo TTE). Juntos, esses dados oferecem subsídios em favor da utilidade do TT como uma nova possibilidade de terapia contra metástases. No entanto, o uso do TT por indivíduos jovens ainda requer cautela e mais estudos, a fim de se conhecer se existe alguma relação entre o uso do fitoterápico e a instalação de lesões pré-malignas.

### **Isenção de responsabilidades:**

As opiniões expressas neste artigo são de responsabilidade dos autores e não representa a posição oficial da instituição ou do financiador. O manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores.

**Recursos financeiros:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº Proc.: 2014/26660-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº Proc.: 305840/2015-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, bolsa concedida por um ano).

**Conflito de Interesses:**

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

**Referências Bibliográficas**

ADAIKAN, P. G.; GAUTHAMAN, K.; PRASAD, R. N. V. History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of Tribulus terrestris. **The Aging Male**, v. 4, p. 163–169, 2001.

ADIMOELJA, A.; ADAIKAN, P. G. Protodioscin from herbal plant Tribulus terrestris L improves the male sexual functions, probably via DHEA. **International Journal of Impotence Research**, v. 9, n. 1, 1997.

ANDROSTEN. Responsável técnico: Dra. Anny M. M. Trentini. **Bula de medicamento**. Colombo: Herbarium Laboratório Botânico Ltda. 2013.

ANTONIO, J. et al. The effects of Tribulus terrestris on body composition and exercise performance in resistance-trained males. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 10, p. 208–215, 2000.

BOSLAND, M. C. Testosterone treatment is a potent tumor promoter for the rat prostate. **Endocrinology**, v. 155, n. 12, p. 4629–4633, 2014.

BOSLAND, M. C. Use of animal models in defining efficacy of chemoprevention agents against prostate cancer. **European Urology**, v. 35, n. 5–6, p. 459–463, 1999.

BROWN, G. et al. Effects of anabolic precursors on serum testosterone concentrations and adaptations to resistance training in young men. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 340–359, 2000.

CHEN, P. -S. et al. Diosgenin, a Steroidal Saponin, Inhibits Migration and Invasion of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Reducing Matrix Metalloproteinases Expression. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20164.

CHHATRE, S. et al. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. **Pharmacognosy Review**, v. 8, n. 15, p. 45–51, 2014.

DEHGHAN, A.; ESFANDIARI, A.; BIGDELI, S. M. Alternative treatment of ovarian cysts with *tribulus terrestris* extract: a rat model. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. e12–e15, 2012.

DENG, Y.; YANG, L.; AN, S. Effect of *Tribulus terrestris* L decoction of different concentrations on tyrosinase activity and the proliferation of melanocytes. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 22, n. 11, p. 1017–1019, 2002.

DO, J. et al. Effects and mechanism of action of a *Tribulus terrestris* extract on penile erection. **Korean Journal of Urology**, v. 54, p. 183–188, 2013.

GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G. Effect of *Tribulus terrestris* on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity and androgen receptors in rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 127–132, 2005.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction - an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, v. 15, p. 44–54, 2008.

GONÇALVES, B. F. et al. A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **Prostate**, v. 73, n. 11, p. 1202–1213, 2013.

GONÇALVES, B. F. et al. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: an approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 1, p. 4–13, 2015.

GONÇALVES, B. F. et al. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, p. 96–106, 2010.

KAINA, B. et al. MGMT : Key node in the battle against genotoxicity , carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair**, v. 6, p. 1079–1099, 2007.

KAM, S. C. et al. In vivo and in vitro animal investigation of the effect of a mixture of herbal extracts from *Tribulus terrestris* and *Cornus officinalis* on penile erection. **The Journal of Sex Medicine**, v. 9, p. 2544–2551, 2012.

KIM, H. J. et al. Aqueous extract of *Tribulus terrestris* Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF- $\kappa$ B signaling in liver cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 197–203, 2011.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris* - chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 111–137, 2005.

KUMAR, M. et al. Chemopreventive potential of *Tribulus terrestris* against 7,12- dimethylbenz (a) anthracene induced skin papillomagenesis in mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 289–294, 2006.

KUMARI, M.; SINGH, P. *Tribulus terrestris* ameliorates metronidazole--induced spermatogenic inhibition and testicular oxidative stress in the laboratory mouse. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 304–310, 2015.

MALVIYA, N. et al. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction - a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 68, n. 1, p. 3–8, 2011.

MARTINO-ANDRADE, A. J. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 165–170, 2010.

MASON, M. A. et al. Use of nutritional supplements by high school football and volleyball players. **The Iowa Orthopedic Journal**, v. 21, p. 43–48, 2001.

MATHUR, M.; SUNDARAMOORTHY, S. Ethnopharmacological studies of *Tribulus terrestris* (Linn). in relation to its aphrodisiac properties. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 1, p. 83–94, 2013.

MONTIRONI, R. et al. International consultation on Prostatic Intraepithelial Neoplasia and pathologic staging of Prostatic Carcinoma. Workgroup 1: origins of Prostate Cancer. **Cancer**, v. 78, n. 2, p. 362–365, 1996.

NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 319–323, 2005.

POKRYWKA, A. et al. Insights into supplements with *Tribulus terrestris* used by Athletes. **Journal of Human Kinetics**, v. 41, n. II, p. 99–105, 2014.

QURESHI, A.; NAUGHTON, D. P.; PETROCZI, A. A Systematic review on the herbal extract Tribulus terrestris and the roots of its putative aphrodisiac and performance enhancing effect. **Journal of Dietary Supplements**, v. 11, n. 1, p. 64–79, 2014.

ROAIAH, M. F. et al. Prospective analysis on the effect of botanical medicine (Tribulus terrestris) on serum testosterone level and semen parameters in males with unexplained infertility. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, p. 1–7, 2016.

ROGERSON, S. et al. The effect of five weeks of Tribulus terrestris supplementation on muscle strength and body composition during preseason training in elite rugby league players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 21, n. 2, p. 348–353, 2007.

SAHIN, K. et al. Comparative evaluation of the sexual functions and NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways of some aphrodisiac herbal extracts in male rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 318, p. 1–11, 2016.

SALGADO, R. M. et al. Effect of oral administration of Tribulus terrestris extract on semen quality and body fat index of infertile men. **Andrologia**, n. April, p. 1–6, 2016.

SANDEEP, P. M.; BOVEE, T. F. H.; SREEJITH, K. Anti-androgenic activity of Nardostachys jatamansi DC and Tribulus terrestris L. and their beneficial effects on polycystic ovary syndrome – Induced rat models. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 13, n. 6, p. 248–254, 2015.

SANSALONE, S. et al. A combination of tryptophan, Satureja montana, Tribulus terrestris, Phyllanthus emblica extracts is able to improve sexual quality of life in patient with premature ejaculation. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**, v. 88, n. 3, p. 171–176, 2016.

SANSALONE, S. et al. Alga Ecklonia bicyclis, Tribulus terrestris, and Glucosamine Oligosaccharide improve erectile function, sexual quality of life, and ejaculation function in patients with moderate mild-moderate erectile dysfunction: a prospective, randomized, placebo-contr. **BioMed Research International**, p. 1–7, 2014.

SHARMA, P.; HUQ, A. U.; SINGH, R. Cypermethrin induced reproductive toxicity in male Wistar rats: protective role of Tribulus terrestris. **Journal of environmental biology**, v. 34, p. 857–862, 2013.

SISTO, M. et al. Saponins from Tribulus terrestris L. protect human keratinocytes from UVB-induced damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 193–

201, 2012.

SUN, B. et al. Investigation on inhibitory and apoptosis-inducing effects of saponins from *Tribulus terrestris* on hepatoma cellline BEL-7402. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 29, n. 7, p. 681–684, 2004.

SUN, B.; QU, W.; BAI, Z. The inhibitory effect of saponins from *Tribulus terrestris* on Bcap-37 breast cancer cell line in vitro. **Zhong Yao Cai**, v. 26, n. 2, p. 104–106., 2003.

TAPLIN, M. E.; HO, S.-M. The Endocrinology of Prostate Cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3467–3477, 2011.

UKANI, M. D.; NANAVATI, D. D.; MEHTA, N. K. A review on the Ayurvedic herb *Tribulus terrestris* L. **Ancient Science of Life**, v. 17, n. 2, p. 144–150, 1997.

WEI, S. et al. Terrestrosin D, a steroidal saponin from *tribulus terrestris* L., inhibits growth and angiogenesis of human prostate cancer in vitro and in vivo. **Pathobiology**, v. 81, p. 123–132, 2014.

YANG, H.; QU, W.; SUN, B. Experimental study of saponins from *Tribulus terrestris* on renal carcinoma cell line. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 30, n. 16, p. 1271–1274, 2005.

YIN, L. et al. Effects of *Tribulus terrestris* L. saponins on exercise performance in overtraining rats and the underlying mechanisms. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 11, p. 1193–1201, 2016.

## Legendas das figuras

Figura 1. *Tribulus terrestris* inibe alterações morfológicas causadas pela exposição ao carcinógeno MNU: cortes histológicos do lobo ventral da glândula prostática masculina do gerbilo corados com Hematoxilina e Eosina. Controle (C): [A] aspecto morfológico normal da próstata. [B] Alteração morfológica de aspecto invasivo (\*) observada nos animais do grupo controle. Indução carcinogênica com N-metil-N-nitrosourea (MNU): [C] e [D] presença de numerosos focos de neoplasias intra-epiteliais prostáticas (NIP), focos inflamatórios periductais (seta preta) e intraluminais (cabeça de seta). Efeitos do uso prolongado do fitoterápico (TTE): [E] e [F] também se observam lesões do tipo NIP e arcos intra-epiteliais (AI). Efeitos combinados do fitoterápico e do agente carcinogênico (MNU+TTE): [G] e [H] o tratamento parece reduzir a frequência de lesões, especialmente em relação ao grupo MNU. Os detalhes evidenciam a diversidade fenotípica nuclear nas regiões onde se observam lesões proliferativas. As setas brancas indicam células com núcleo descompactado e nucléolos evidentes, comuns nesse tipo de lesão. Ep: epitélio; Es: estroma; Lu: lúmen.

Figura 2. Embora todos os grupos apresentem lesões malignas, os grupos com aplicação de *Tribulus terrestris* apresentam os menores valores para este tipo de lesão: cortes histológicos do lobo ventral da glândula prostática masculina do gerbilo corados com Reticulina de Gömori. As lesões do tipo NIP em que foram observadas rupturas da membrana basal e extravasamento de células para outros compartimentos foram consideradas lesões malignas. As setas finas demonstram a organização normal das fibras reticulares que formam o arcabouço dos ácinos glandulares. As setas brancas indicam o local de rompimento da membrana basal. As setas pretas largas indicam fenótipo nuclear de células proliferativas dispersas no estroma glandular. Ep: epitélio; Es: estroma; Lu: lúmen.

Figura 3. Análise estatística da multiplicidade de lesões encontradas no lobo ventral da próstata de machos do gerbilo da Mongólia sugere que o *Tribulus terrestris* pode ter papel quimioprotetor. Os menores índices de lesões malignas são encontrados nos grupos que receberam doses do fitoterápico. Nas lesões pré-malignas, não foram encontradas diferenças significantes. Nas lesões malignas, o asterisco (\*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MNU. Na multiplicidade total, o asterisco indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C e MNU+TTE (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p < 0,05$ ).

Figura 4. Os dados estereológicos evidenciam a plasticidade dos compartimentos glandulares no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia e indicam que o *Tribulus terrestris* não tem capacidade de induzir a proliferação. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. [A] Frequência do compartimento epitelial. \*\*\* diferença estatística em relação ao C ( $p < 0,0001$ ); \* diferença estatística em relação ao MNU ( $p < 0,05$ ). [B] Frequência do compartimento luminal. \* diferença estatística em relação ao C ( $p < 0,05$ ). Não há diferenças entre os grupos em relação à frequência do compartimento estromal muscular [C] ou do compartimento estromal não-muscular [D]. (One-way ANOVA/Tukey, dados paramétricos).

Figura 5. *Tribulus terrestris* causa redução da marcação de células AR-positivas no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia. [A] Frequência de células AR-positivas por campo no compartimento epitelial. \*\*\* indica diferença estatística em relação aos grupos C e MNU ( $p < 0,0001$ ); \*\* indica diferença estatística em relação ao grupo TTE ( $p < 0,05$ ). [B] Frequência de células AR-positivas por campo no compartimento estromal. \*\*\* indica diferença estatística em relação ao grupo C ( $p = 0,0003$ ); \*\* indica diferença estatística em relação ao MNU+TTE ( $p < 0,05$ ). [C] Frequência total de células AR-positivas por campo. \*\*\* indica diferença estatística em relação aos grupos C e MNU ( $p < 0,0001$ ); \* indica diferença estatística em relação ao grupo MNU+ TTE ( $p < 0,05$ ). (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos). [D]-[G] Marcação de células AR-positivas (setas escuras) e AR-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [H] Controle negativo.

Figura 6. *Tribulus terrestris* causa redução na frequência de células epiteliais basais do lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia apenas no grupo TTE. [A] Frequência de células basais p63-positivas por campo no compartimento epitelial. \* indica diferença estatística em relação aos grupos C e MNU+TTE ( $p < 0,05$ ); \*\*\* indica diferença estatística em relação ao grupo TTE ( $P = 0,0006$ ). (One-way ANOVA/Tukey, dados paramétricos). [B]-[E] Marcação de células p63-positivas (setas escuras) e p63-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [F] Controle negativo.

Figura 7. Uso do *Tribulus terrestris* apresenta efeito antiproliferativo no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia, segundo marcação para o PCNA. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos). [A] Densidade de células PCNA-positivas por corte no compartimento epitelial. \* indica

diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MNU ( $p < 0,05$ ). [B] Densidade de células PCNA-positivas por corte no compartimento estromal. \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MNU ( $p = 0,0094$ ). [C] Densidade total de células PCNA-positivas por corte. \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MNU ( $p = 0,01$ ). [D]-[G] Marcação de células PCNA-positivas (setas escuras) e PCNA-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [H] Controle negativo.

Figura 8. *Tribulus terrestris* indica tendência de aumento nos eventos de apoptose no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia. [A] Densidade de células TUNEL-positivas por corte no compartimento epitelial. [B] Densidade de células TUNEL-positivas por corte no compartimento luminal. [C] Densidade de células TUNEL-positivas por corte no compartimento estromal. [D] Densidade total de células TUNEL-positivas por corte. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p > 0,05$ ). [E]-[H] Marcação de células TUNEL-positivas (setas escuras) e TUNEL-negativas (setas claras) em campos dos grupos C, MNU, TTE e MNU+TTE, respectivamente. [I] Controle negativo.

### Legenda da tabela

Tabela 1. Os tratamentos aplicados não causaram alterações nos dados biométricos para a massa corporal, complexo prostático (próstata + vesícula seminal + uretra prostática), lobo ventral isolado (LV), testículos e adrenais.

Rodapé: Os dados são expressos em gramas (média  $\pm$  EP). Os valores apresentados para testículo e adrenal foram obtidos a partir da média entre o par de órgãos. n: número de animais por grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunns, dados não paramétricos,  $p > 0,05$ ).

Figuras

Figura 1

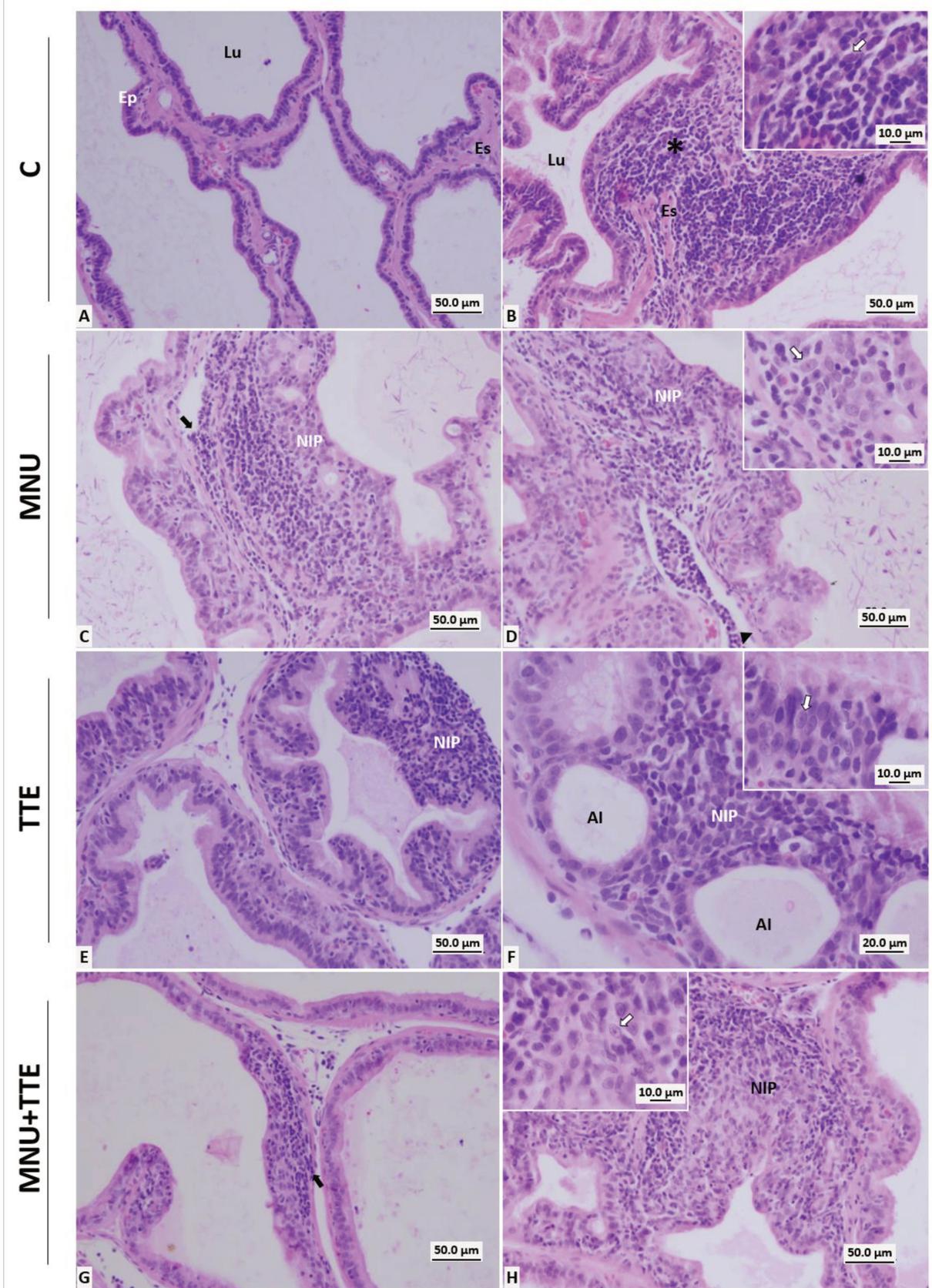


Figura 2

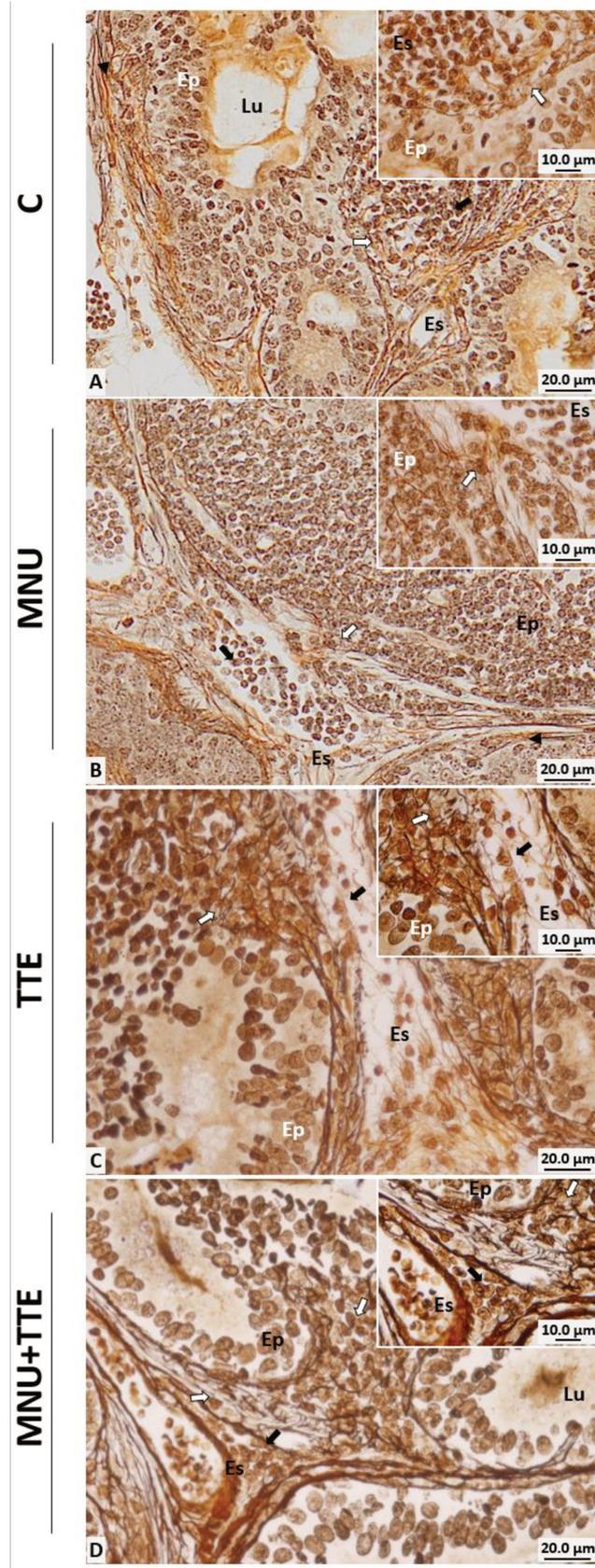


Figura 3

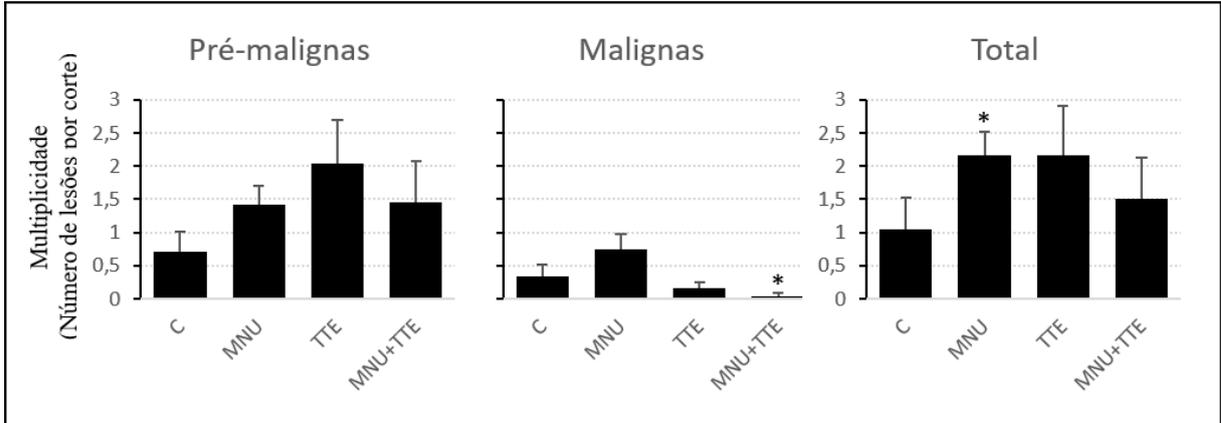


Figura 4

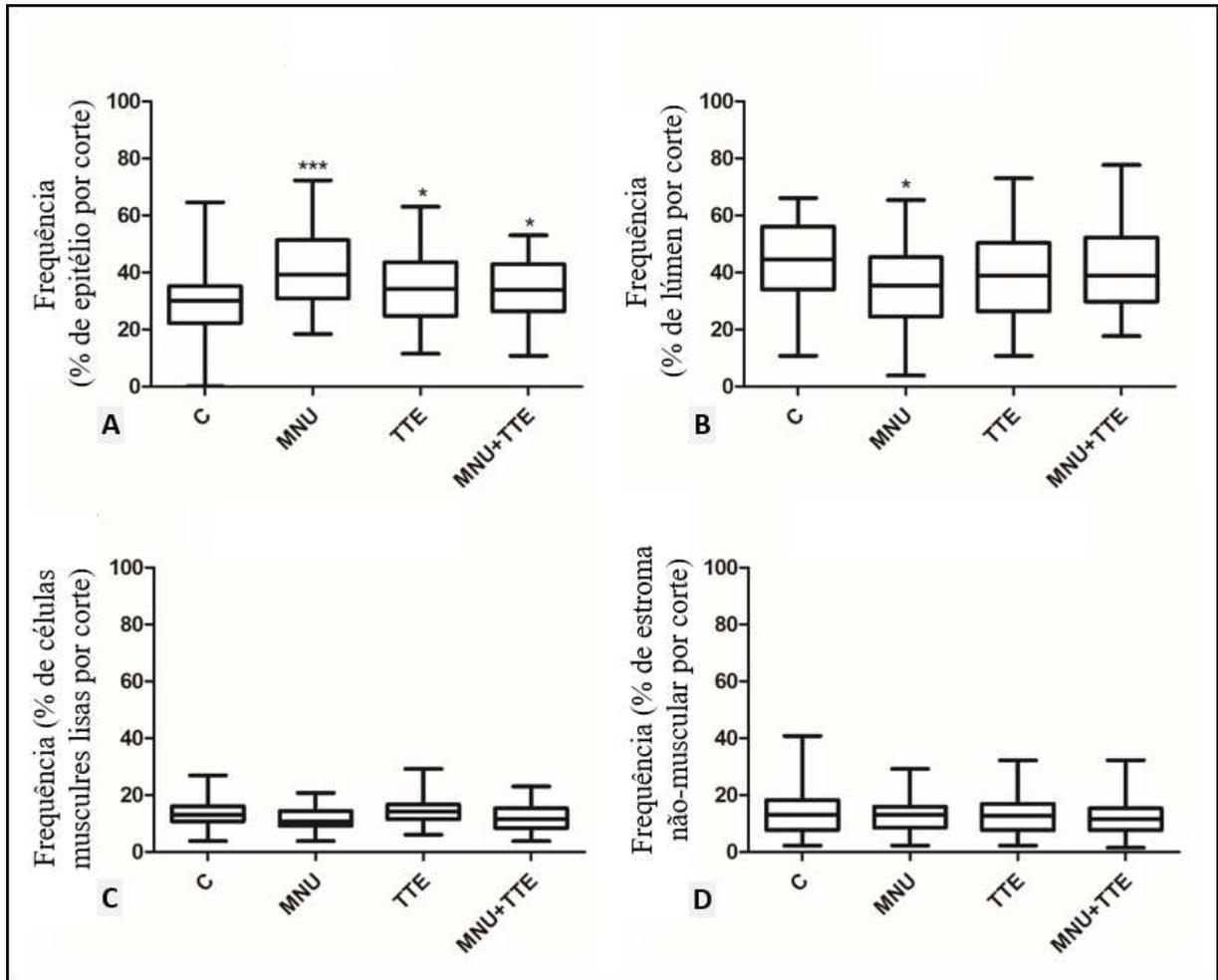


Figura 5

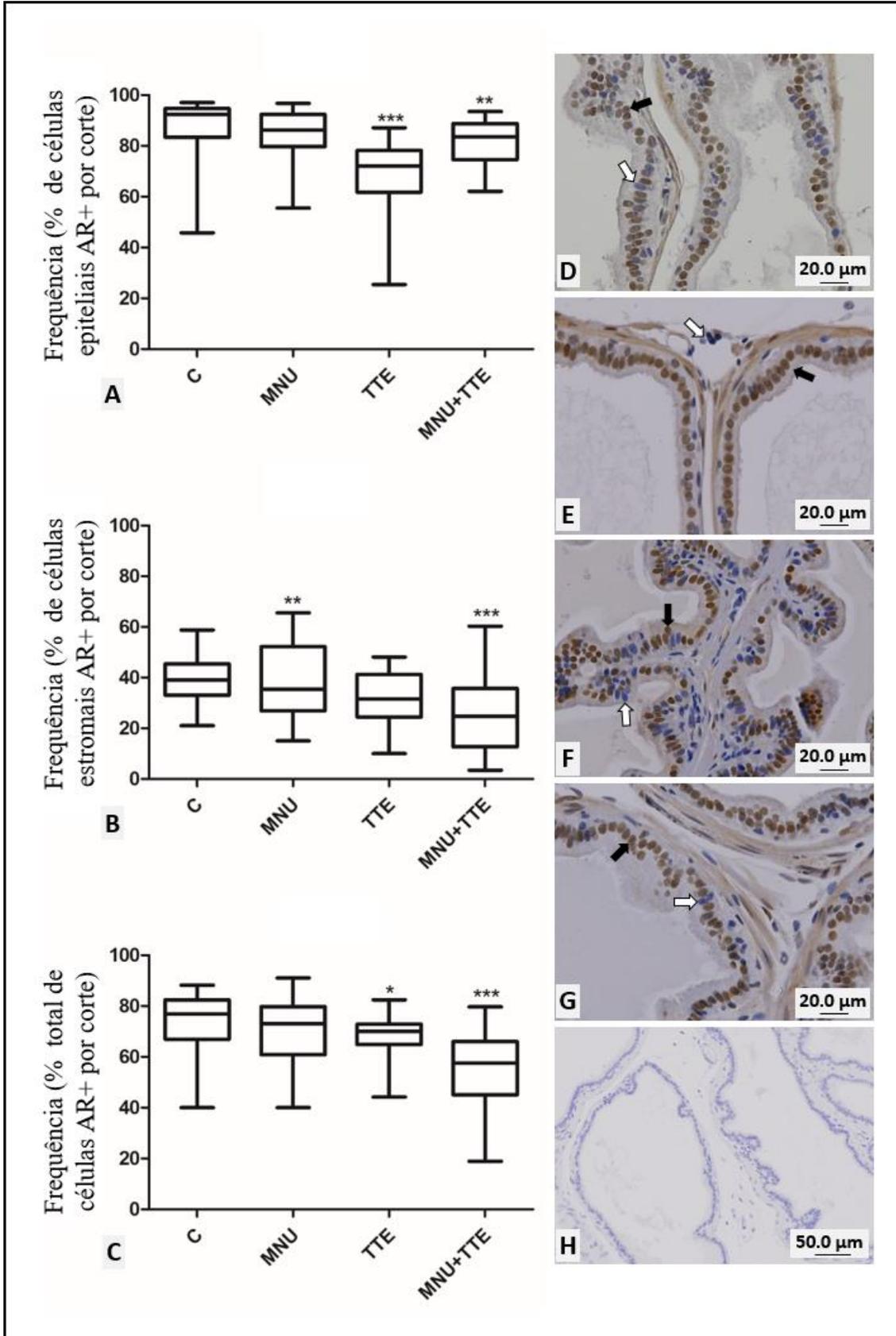


Figura 6

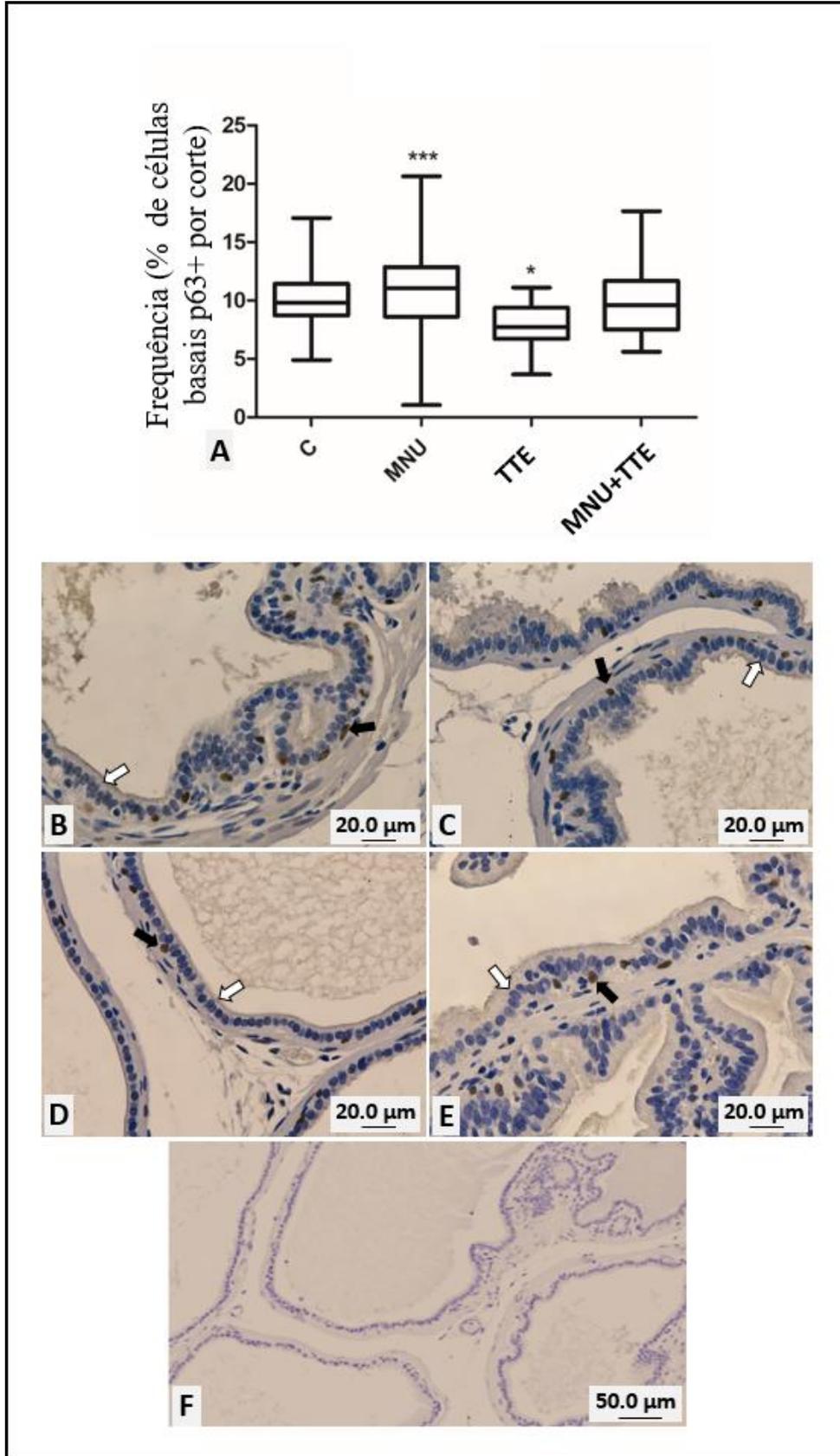


Figura 7

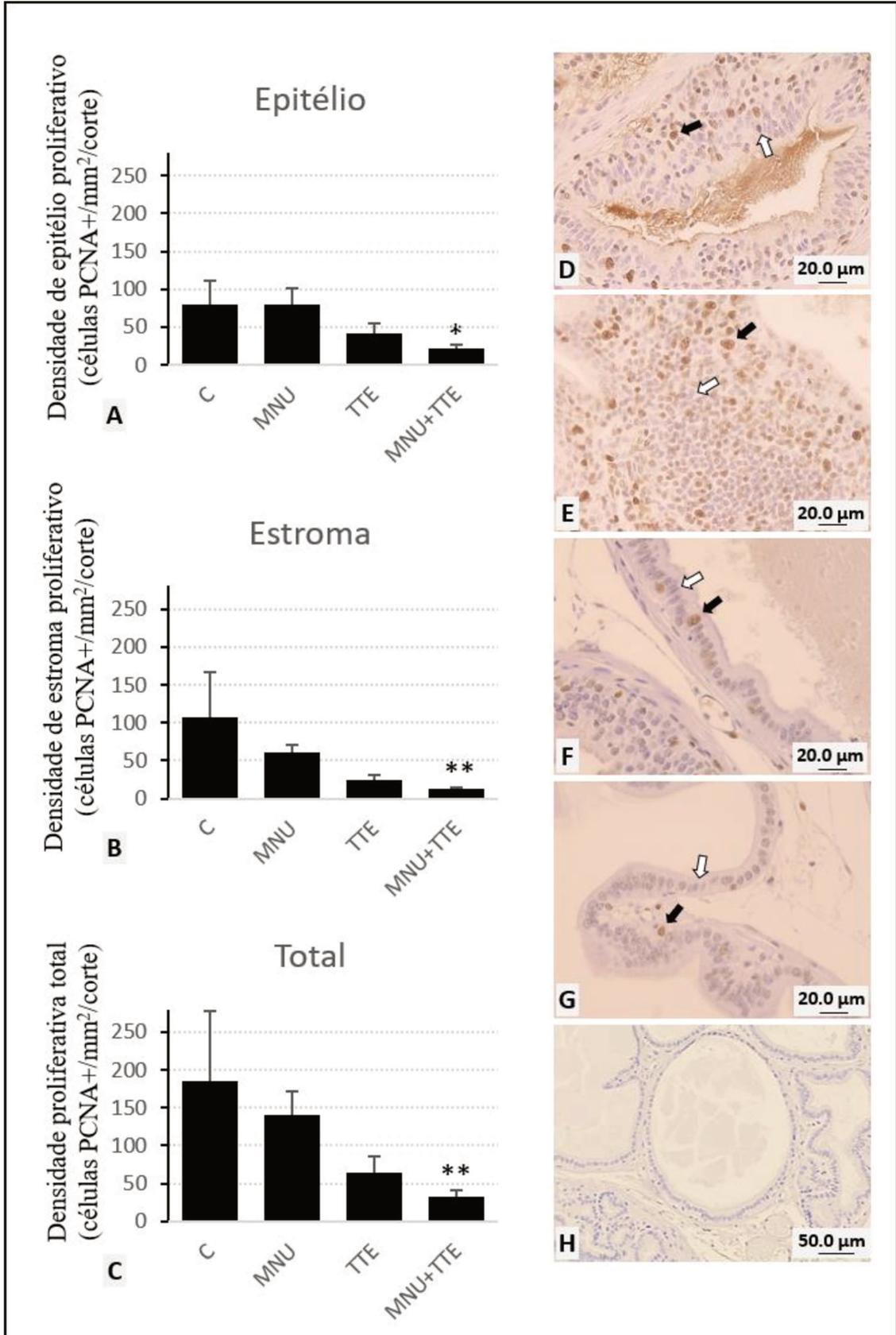
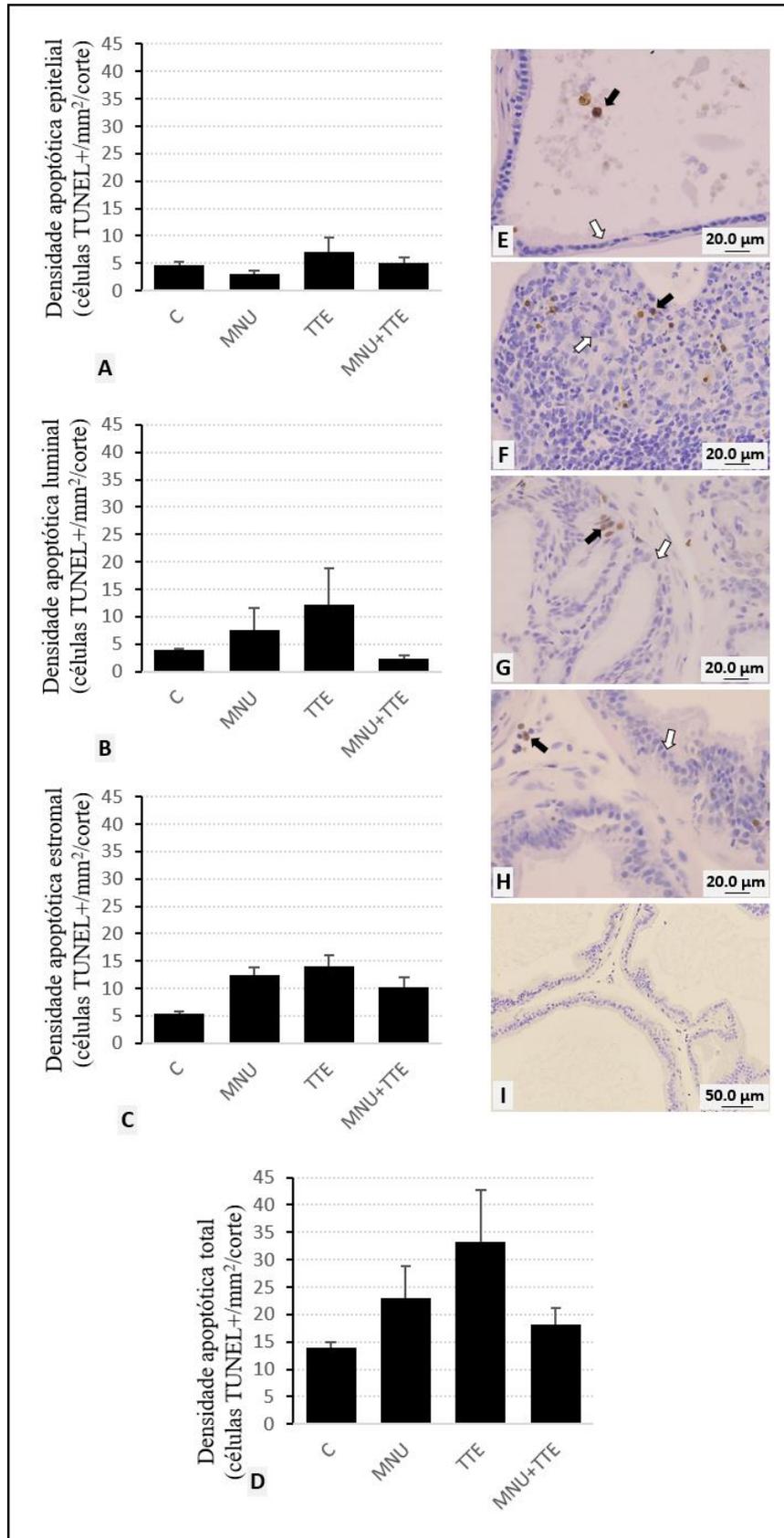


Figura 8



**Tabela**

Tabela 1

n = 6	Corpo			Complexo	LV	Testículo	Adrenal
	90 dias	180 dias	270 dias				
C	67,33 ± 2,23	72,00 ± 1,37	83,33 ± 5,65	0,62 ± 0,09	0,02 ± 0,004	0,60 ± 0,03	0,02 ± 0,002
MNU	67,33 ± 1,52	77,67 ± 3,70	83,00 ± 4,95	0,61 ± 0,03	0,02 ± 0,002	0,61 ± 0,02	0,02 ± 0,001
TTE	68,67 ± 2,29	71,00 ± 1,77	83,33 ± 2,77	0,72 ± 0,05	0,02 ± 0,003	0,59 ± 0,01	0,02 ± 0,001
MNU+TTE	69,67 ± 1,67	73,67 ± 2,65	73,67 ± 1,75	0,67 ± 0,05	0,03 ± 0,003	0,55 ± 0,03	0,02 ± 0,002

## 7 DISCUSSÃO

---

O uso do TT para o tratamento de inúmeras doenças é muito comum em medicinas tradicionais, como a chinesa, árabe, búlgara e indiana (CHHATRE et al., 2014; NEYCHEV & MITEV, 2016). No entanto, apesar de cada sistema de medicina cultural ter uma origem distinta, é interessante notar que o consumo do TT tem objetivos comuns em todas elas. Um dos mais citados nos diferentes sistemas é a capacidade do fitoterápico de melhorar o desempenho sexual. Para tentar compreender as razões para este efeito, pesquisadores se dedicaram ao estudo dos componentes presentes em cada parte da planta. Por conta da alta concentração, da natureza esteroideal e da semelhança molecular com a DHEA, a protodioscina foi considerada como o principal princípio ativo no TT, estando presente em todas as partes aéreas da planta, especialmente nos frutos (ADAIKAN et al., 2001; MATHUR & SUNDARAMOORTHY, 2013). Desde a primeira patente, o extrato de TT tem sido comercializado como um indutor da produção de andrógenos, um instrumento eficaz na manutenção do equilíbrio hormonal, sem atuar como uma fonte de hormônios exógenos, mas estimulando o próprio organismo a aumentar a liberação de LH, DHEA, DHT e testosterona (ADIMOELJA e ADAIKAN, 1997; GAUTHAMAN & ADAIKAN, 2005; GAUTHAMAN e GANESAN, 2008; CHHATRE et al., 2014; ISMAIL et al., 2014).

Sob a promessa de elevar os níveis de testosterona e da segurança inerente aos ditos produtos naturais, o TT se popularizou entre praticantes de atividades físicas que buscavam ganhos em disposição, resistência e massa muscular, como uma alternativa legal aos anabolizantes. Assim, o fitoterápico que antes era indicado apenas para homens em idade relativamente mais avançada, passou a ser utilizado por homens e mulheres de todas as idades, com doses pouco controladas e por tempo indeterminado. Entretanto, por não serem considerados como medicamentos, muitos produtos naturais têm sua ação baseada em crenças populares e são pouco estudados experimentalmente (POKRYWKA et al., 2014). Além disso, por escaparem de controles de qualidade tão rigorosos quanto os medicamentos, abre-se oportunidade para que os produtores e ou comerciantes contaminem o produto com compostos de conhecida ação anabolizante, de forma a garantir resultados mais satisfatórios (MASON et al., 2001; POKRYWKA et al., 2014).

Diante da possibilidade do TT interferir no equilíbrio de andrógenos e da sua popularidade ascendente, e sabendo que a próstata é um órgão dependente de andrógenos desde a sua formação embrionária até o fim da vida adulta, este trabalho se propôs, inicialmente, a

oferecer subsídios experimentais relacionados à segurança do uso desse fitoterápico. Nossa preocupação inicial era que, ao elevar as taxas de testosterona, o TT pudesse contribuir para a instalação de desordens proliferativas na próstata, já que este hormônio é considerado um potente agente promotor de neoplasias (BOSLAND, 2014). Para tanto, nós fizemos uma extensa revisão da bibliografia a respeito do assunto, de forma a juntar evidências que embasassem nossa pesquisa.

Apesar da revisão ter revelado inúmeras funções atribuídas ao fitoterápico, nós selecionamos aquelas que diziam respeito ao uso do TT sobre os aspectos da biologia reprodutiva, como mostrado no Capítulo I deste trabalho. De forma até surpreendente, apesar da popularidade e do apelo dos comerciantes pelo potencial androgênico do TT, nós encontramos muitos dados conflitantes a esse respeito. Embora alguns estudos sugiram que o TT seja capaz de interferir no metabolismo androgênico, muitos outros questionam essa capacidade. Além disso, durante a pesquisa bibliográfica, nós nos deparamos com outra possibilidade de ação do TT: a de que o fitoterápico poderia desempenhar um papel de quimioproteção. Assim, surge o questionamento que sustentou o presente estudo: seria o TT capaz de promover o surgimento de lesões na próstata, devido ao seu potencial androgênico, ou seria ele capaz de proteger o órgão, devido ao seu potencial quimioprotetor?

Com o objetivo de responder a essa questão, nós elaboramos o delineamento experimental apresentado nos Capítulos II e III. A escolha do extrato seco de TT se deu por conta do seu uso costumeiro. No Capítulo II, a administração do extrato na segunda metade da vida adulta do gerbilo buscou simular o uso do fitoterápico por indivíduos de idade relativamente mais avançada, visto que o experimento começa aos seis e termina aos nove meses de idade. No Capítulo III, a administração do TT buscou simular o uso comum nos dias atuais, por indivíduos jovens e por tempo prolongado, tendo início aos três e fim aos nove meses de idade. A escolha do momento da exposição ao MNU, aos 180 dias de idade, teve por objetivo fornecer um tempo de latência de pelo menos três meses para a ação do carcinógeno, com base em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (GONÇALVES et al., 2010 e 2013). Dessa forma, foi possível estudar os efeitos do uso do fitoterápico em tempos diferentes e as consequências desse consumo para a histofisiologia prostática na presença ou na ausência do agente carcinogênico. Além disso, foi possível determinar se o TT teria a capacidade de antecipar o surgimento de lesões comuns em gerbilos mais velhos.

As duas intervenções experimentais são concordantes ao demonstrarem que o TT não desempenha papel anabolizante e não antecipa o surgimento de lesões malignas no lobo ventral da próstata do gerbilo, independente do tempo de exposição. Esses dados engrossam o

segmento que defende que o TT não é eficiente na elevação dos níveis séricos de testosterona e oferecem subsídios em defesa de que o seu consumo não oferece riscos à histofisiologia prostática relacionados com o metabolismo de andrógenos *in vivo* (NEYCHEV & MITEV, 2005; MARTINO-ANDRADE, 2010; KUMARI & SINGH, 2015; ROAIAH et al., 2016). De forma oposta, este trabalho indica que o tratamento com TT em animais propensos ao desenvolvimento do câncer prostático pode minimizar a incidência de lesões malignas com o envelhecimento. Nesse sentido, pode-se inferir que o TT desempenha um papel quimioprotetor, atenuando os efeitos deletérios da idade ou da exposição a agentes tóxicos, como a MNU. Essa hipótese já havia sido levantada em estudos com outras plantas ricas em saponinas (YUE et al., 2007; KIM, 2008) e até mesmo com o próprio TT (DENG et al., 2002; SUN et al., 2003 WEI et al., 2014). Grande parte desses estudos foram feitos com células em cultura, enquanto o presente trabalho propõe que o mesmo efeito pode ser observado *in vivo*. Entretanto, apesar desses resultados favoráveis, a relação do TT com a incidência de lesões pré-malignas não ficou clara. Os dados apresentados pelo estudo do uso prolongado, embora não tenham alcançado relevância estatística, indicam que a exposição precoce ao TT pode desencadear o aumento de lesões pré-malignas. Novos estudos são necessários para verificar se essa relação existe de fato e de que forma ela ocorre, sendo recomendável, portanto, cautela ao optar pelo consumo do fitoterápico, especialmente por indivíduos mais jovens.

Os experimentos realizados também nos permitem sugerir possíveis mecanismos que explicariam a atuação protetora do fitoterápico em relação às lesões malignas. Primeiramente, houve uma ação específica do TT em reduzir a atividade da via androgênica canônica (diminuição de receptores de andrógenos e de proliferação de células epiteliais) com leve aumento da frequência de apoptose, e afetando pontualmente a frequência de células basais (p63-positivas) apenas no tratamento a longo prazo. Dados da literatura apontam para uma atividade antiproliferativa do TT, através do interrompimento do ciclo celular nas fases S e G2/M através da modulação da expressão de ciclinas, bem como pela indução de apoptose, por meio da redução na expressão de proteínas antiapoptóticas e aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas (CHENG et al., 2011). Além disso, o TT também demonstrou atividade antiandrogênica *in vitro* e foi capaz de atenuar os sintomas da síndrome do ovário policístico em fêmeas de ratos Sprague-Dawley, a qual é influenciada por andrógenos, de maneira dependente da dose. Os autores defendem que o TT pode ser capaz de reduzir o nível de testosterona, inibir a atividade transcricional do AR e, assim, prevenir a resposta fisiológica a andrógenos *in vivo* (SANDEEP et al., 2015).

A segunda ação protetora do TT pode estar relacionada com a presença de moléculas que interferem na expressão de proteínas relacionadas com a transição epitélio-mesenquimal, importante para a invasividade tumoral. A progressão tumoral na próstata é um evento multifatorial que envolve a transformação de células normais que passam a exibir maior potencial de crescimento, mobilidade e invasividade que culminam na metástase. Todo esse processo depende não somente da transformação que ocorre nas células epiteliais, mas também da modificação do microambiente glandular durante a transição epitélio mesenquimal, com intensa modificação das células e componentes do estroma (GONÇALVES et al., 2015). A diosgenina, uma das saponinas esteroidais presentes no extrato de TT, mostrou ser eficiente na inibição da migração e invasividade de células da linhagem PC-3 por reduzir a expressão de metaloproteinases e outros componentes envolvidos na remodelação da matriz extracelular e na resposta ao estresse (CHEN et al., 2011). Dados como esse podem ajudar a explicar como o tratamento aplicado neste estudo colaborou para a redução da multiplicidade de lesões malignas, ainda que alguns grupos tenham apresentado alto número de neoplasias intra-epiteliais.

Este trabalho é inicial, e os estudos a respeito do potencial quimioprotetor de compostos naturais é uma novidade no nosso grupo de pesquisa. Dado o consumo cada vez maior desse tipo de produto, que oferece uma sensação de segurança nem sempre verdadeira, faz-se necessário que a comunidade científica se empenhe em testar novos compostos, de forma a oferecer subsídios experimentais a respeito da sua eficácia e segurança. Os dados apresentados até aqui são uma base para novas pesquisas que podem ajudar a elucidar os mecanismos pelos quais o TT pode auxiliar na prevenção de doenças de grande importância, como o câncer de próstata.

## 8 CONCLUSÃO

---

Nas condições experimentais estabelecidas, o TT não foi capaz de provocar a elevação dos níveis de testosterona e não alterou parâmetros biométricos de órgãos andrógeno-sensíveis do gerbilo da Mongólia. O mesmo se dá com o uso em curto e em longo prazo, o que permite inferir que o fitoterápico não apresenta efeito anabolizante neste modelo experimental, na dose e nos períodos utilizados neste trabalho. Além disso, a combinação de TT com o carcinógeno MNU não antecipou a instalação de lesões malignas no lobo ventral da próstata. Ao contrário, o extrato mostrou efeito quimioprotetor, reduzindo o número de lesões totais, especialmente as lesões malignas, quando comparado com o grupo controle da indução (grupo MNU), reduzindo a densidade de células em proliferação e a frequência de células AR-positivas. No entanto, o consumo de TT parece não evitar o surgimento de lesões pré-malignas e, em alguns casos, pode estar relacionado com o aumento dessas lesões, especialmente quando o consumo se dá por indivíduos mais jovens. Juntos, esses dados oferecem subsídios em favor da segurança do uso do TT para a saúde prostática por não interferir negativamente no metabolismo androgênico atuante sobre a glândula e por diminuir a multiplicidade de lesões malignas no órgão. No entanto, novos estudos são necessários para compreender a relação do TT com as lesões pré-malignas e os mecanismos moleculares envolvidos em todas as respostas observadas neste estudo.

Respondendo aos objetivos específicos propostos no início deste trabalho:

- O *Tribulus terrestris* não é eficiente como indutor da produção de testosterona no gerbilo da Mongólia,
- O *Tribulus terrestris* não é capaz de induzir respostas biométricas (massa) em órgãos andrógeno-responsivos, tais como o complexo prostático, o lobo ventral isolado, testículos e adrenais do gerbilo. O mesmo se diz a respeito da massa corporal;
- O *Tribulus terrestris* não induz alterações significativas na frequência relativa dos compartimentos (epitelial, luminal e estromal muscular e não-muscular) do lobo ventral da próstata do gerbilo;
- O *Tribulus terrestris* não desempenha o papel de gatilho para instalação de lesões prostáticas induzidas pela exposição ao MNU. Ao contrário, o fitoterápico atua como agente quimioprotetor, atenuando os efeitos deletérios da idade e auxiliando a evitar a malignidade de lesões nos animais

normais ou expostos ao carcinógeno. Os dados apresentados corroboram resultados já observados *in vitro*;

- O *Tribulus terrestris* reduziu a atividade da via androgênica canônica ao provocar a diminuição de receptores de andrógenos e de proliferação de células epiteliais;
- O presente estudo oferece subsídios experimentais a favor da ação do *Tribulus terrestris* em frear a transição de lesões pré-malignas para malignas, mas lança questionamentos referentes da segurança do consumo do fitoterápico por indivíduos mais jovens, nos quais o mesmo parece ter contribuído para o aumento de lesões pré-malignas. Novos estudos são necessários para avaliar se essa relação existe de fato e de que forma o TT pode influenciar o surgimento de eventos proliferativos na próstata de indivíduos jovens.

## 9 REFERÊNCIAS

---

ADAIKAN, P. G.; GAUTHAMAN, K.; PRASAD, R. N. V. History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*. **The Aging Male**, v. 4. P. 163-169, 2001.

ADIMOELJA, A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. **International Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 82-84, 2000.

ADIMOELJA, A.; ADAIKAN, P. G. Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L improves the male sexual functions, probably via DHEA. **International Journal of Impotence Research**, v. 9, n. 1, 1997.

AMIN, A. et al. The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1084, p. 391-401, 2006.

ANDROSTEN. Responsável técnico: Dra. Anny M. M. Trentini. **Bula de medicamento**. Colombo: Herbarium Laboratório Botânico Ltda. 2013.

ANTONIO, J. et al. The effects of *Tribulus terrestris* on body composition and exercise performance in resistance-trained males. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 10, p. 208-215, 2000.

BANUDEVI, S. et al. Protective effect of zinc on N-methyl-N-nitrosourea and testosterone-induced prostatic intraepithelial neoplasia in the dorsolateral prostate of Sprague Dawley rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 267, n. 2, p. 251-255, 2011.

BHATIA, H. et al. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1005-1018, 2014.

BOONE, C. W.; STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J. Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents. **Mutation Research**, v. 267, n. 2, p. 251-255, 1992.

BOSLAND, M. C. Testosterone Treatment Is a Potent Tumor Promoter for the Rat Prostate. **Endocrinology**, v. 155, n. 12, p. 4629–4633, 2014.

BOSLAND, M. C. Use of animal models in defining efficacy of chemoprevention agents against prostate cancer. **European Urology**, v. 35, n. 5-6, p. 459-463, 1999.

BOYLE, P. New insights into the epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 386, p. 3-18, 1994.

BROWN, G. A. et al. Effects of anabolic precursors on serum testosterone concentrations and adaptations in resistance training in young man. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 10, p. 340-359, 2000.

CAMPOS, S. G. P. et al. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 1, p. 13-24, 2008.

CAMPOS, S. G. P. et al. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 7, p. 723-33, 2006.

CARVALHO-SALLES, A. B.; TAJARA, E. H. Fatores Hormonais e Genéticos na Próstata Normal e Neoplásica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 3, p. 177-185, 1999.

CHANG, P.C. et al. Influence of dietary fat on the induction of mammary tumors by N-nitrosomethylurea: associated hormone changes and differences between Sprague–Dawley and F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 59, p. 1279–1283, 1977.

CHEN, G. et al. New steroidal glycosides from *Tribulus terrestris* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 8, p. 780-784, 2012.

CHEN, P. S. et al. Diosgenin, a Steroidal Saponin, Inhibits Migration and Invasion of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Reducing Matrix Metalloproteinases Expression. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1-10, 2011.

CHENG, T. C. et al. Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC-3 by Flavonoids and Saponins Prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11319-11329, 2011.

CHHATRE, S. et al. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, n. 15, p. 45–51, 2014.

CHU, S. et al. Effect of saponin from *Tribulus terrestris* on hyperlipidemia. **Zhong Yao Cai**, v. 26, n. 5, p. 341-344, 2003.

COLLINS, L.; BASARIA, S. Adverse effects of androgen deprivation therapy in men with prostate cancer: a focus on metabolic and cardiovascular complications. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, p. 222-225, 2012.

CONDON, M. S. et al. Multiple pathways of prostate carcinogenesis analyzed by using cultured cells isolated from rats treated with N-methyl-N-nitrosourea and testosterone. **Molecular Carcinogenesis**, v. 25, n. 3, p. 179-186, 1999.

CUNHA, G. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine Reviews**, v. 8, p. 338-362, 1987.

CUSTODIO, A. M. et al. Disorders related with ageing in the gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91, n. 2, p. 132-143, 2010.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 184 p.

DENG, Y.; YANG, L.; AN, S. Effect of *Tribulus terrestris* L decoction of different concentrations on tyrosinase activity and the proliferation of melanocytes. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 22, n. 11, p. 1017-1019, 2002.

DINCHEV, D. et al. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. **Phytochemistry**, v. 69, p. 176-186, 2008.

EMANUEL, N. M. et al. Experimental and clinical studies of the antitumor activity of l-methyl-l-nitrosourea (NSC 23909). **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 58, p. 135-148, 1974.

EPA Air Toxics. **EPA Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants**. Disponível em: <http://www3.epa.gov/ttn/atw/hlthef/nitro-n-.html++>. Acesso em 26 de abr. 2017.

FAUSTINO-ROCHA, A. I. et al. N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9095-9117, 2015.

FRANZ, M. C. et al. Zinc transporters in prostate cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 0, p. 735-741, 2013.

GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G. Effect of *Tribulus terrestris* on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity and androgen receptors in rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 127–132, 2005.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction - an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, v. 15, p. 44-54, 2008.

GAYNOR, M. L. Isoflavones and the prevention and treatment of prostate disease: Is there a role? **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 70, n. 3, p. 203-216, 2003.

GONÇALVES, B. F. et al. A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **Prostate**, v. 73, n. 11, p. 1202-1213, 2013.

GONÇALVES, B. F. et al. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: an approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 1, p. 4-13, 2015.

GONÇALVES, B. F. et al. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, p. 96-106, 2010.

GRIFFITHS, K. et al. Phytoestrogens and diseases of the prostate gland. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 12, p. 625–647, 1998.

HAYWARD, S. W. et al. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. **Acta Anatomica**, v. 155, p. 81-93, 1996.

HO, C. C. K.; TAN, H. M. Rise of herbal and traditional medicine in erectile dysfunction management. **Current Urology Reports**, v. 12, p. 470–478, 2011.

HUANG, J. W. et al. Terrestriins A and B, two new steroid saponins from *Tribulus terrestris*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.5, n. 4, p. 285-290, 2003.

HUGGINS, C.; HODGES, C. V. I. The Effect of Castration, Of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. **Cancer Research**, v. 1, p. 293-297, 1941.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Cancer incidence in five continents. **International Association of Cancer Registries**. Lyon, France: IARC Press, 2005.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Próstata. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao++>. Acesso em 18 de jun. 2016.

ISAACS, J. T.; COFFEY, D. S. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. **Prostate**, v. 2, p. 33-50, 1989.

ISAACS, J. T.; FURUYA, Y.; BERGES, R. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. **Seminars in Cancer Biology**, v. 5, p. 391-400, 1994.

ISMAIL, S. B. et al. Comparison on the effects and safety of tualang honey and tribestan in sperm parameters, erectile function, and hormonal profiles among oligospermic males. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-10, 2014.

IVANOVA, A. et al. Intraspecific Variability of Biologically Active Compounds of Different Populations of *Tribulus Terrestris* in Thracian Floristic Region. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 2, p. 2357–2361, 2011.

JEFFERS, G. W.; KLEI, T. R.; ENRIGHT, F. M. Activation of the jird (*Meriones unguiculatus*) macrophages by the filarial parasite *Brugia paghangi*. **Infection and Immunity**, v. 43, n. 1, p. 43-48, 1984.

JOSEPH, I. B. J. K. et al. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. **Clinical cancer research**, v. 3, p. 2507–2511, 1997.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 535 p.

KAINA, B. et al. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair**, v. 6, p. 1079-1099, 2007.

KELLY, M. G. et al. Carcinogenicity of 1-Methyl-1-Nitrosourea in newborn mice and rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 41, n. 3, p. 619-626, 1968.

KEMPF, S. R.; IVANKOVIC, S. Chemotherapy-induced malignancies in rats after treatment with Cisplatin as single agent and in combination: preliminary results. **Oncology**, v. 43, p. 187-191, 1986.

KIM, J. Protective effects of Asian dietary items on cancers – soy and ginseng. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 9, p. 543-548, 2008.

KIRSCHENBAUM, A. et al. Prostatic acid phosphatase alters the RANKL/OPG system and induces osteoblastic prostate cancer bone metastases. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4526–4533, 2016.

KOESTNER, A. Characterization of N-nitrosourea-induced tumors of the nervous system; their prospective value for studies of neurocarcinogenesis and brain tumor therapy. **Toxicologic Pathology**, v. 18, p. 186-192, 1990.

KOLARIĆ, K. Combination chemotherapy with 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) and cyclophosphamide in solid tumors. **Zeitschrift für Krebsforschung und klinische Onkologie. Cancer research and clinical oncology**, v. 89, n. 3, p. 311-319, 1977.

KOSTOVA, I. et al. Two new sulfated furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, n. 1-2, p. 33-38, 2002.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris* - Chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 111–137, 2005.

KOZLOVA, O. I.; PEREDERIAEV, O. I.; RAMENSKAIA, G. V. Determination by high performance chromatography, steroid saponins in a biologically active food supplements containing the extract of *Tribulus terrestris*. **Vopr Pitan**, v. 80, n. 6, p. 67-71, 2011.

KUMAR, D. G. et al. Modulatory effects of *Crataeva nurvala* bark against testosterone and N-methyl-N-nitrosourea-induced oxidative damage in prostate of male albino rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 32, p. 285–291, 2012.

KUMARI, M.; SINGH, P. *Tribulus terrestris* ameliorates metronidazole-induced spermatogenic inhibition and testicular oxidative stress in the laboratory mouse. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 304–310, 2015.

KURITA, T. et al. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, p. 192–200, 2001.

KURITA, T. et al. Role of p63 and basal cells in prostate. **Development**, v. 131, n. 20, p. 4955-4964, 2004.

LEE, C.; KOZLOWSKI, J.M.; GRAYHACK, J. T. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. **Prostate**, v. 31, p. 131-138, 1997.

LIAO, Z. et al. Interrelationships among angiogenesis, proliferation, and apoptosis in the tumor microenvironment during N-methyl-N-nitrosourea androgen-induced prostate carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 10, p. 1701–1711, 2002.

LIAO, Z. et al. Increased phospho-AKT is associated with loss of the androgen receptor during the progression of N-methyl-N-nitrosourea-induced prostate carcinogenesis in rats. **Prostate**, v. 64, n. 2, p. 186-199, 2005.

LIEM, A. et al. **Functional Anatomy of the Vertebrates: An Evolutionary Perspective**. 3. ed. [S.l.]: Cengage Learning, 2001. 784 p.

LIU, T. et al. Two new steroidal saponins from *Tribulus terrestris* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 1, p. 30-35, 2010.

LÖW, E. C. V. et al. Facts and Fiction of Phytotherapy for Prostate Cancer: A Critical Assessment of Preclinical and Clinical Data. **In vivo**, v. 21, p. 189-204, 2007.

LV, A. L. et al. One new cinnamic imide dervative from the fruits of *Tribulus terrestris*. **Natural Product Research**, v. 22, n. 11, p. 1013-1016, 2008.

MALVIYA, N. et al. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction - A review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 68, n. 1, p. 3-8, 2011.

MARKER, P.C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, p. 165-174, 2003.

MARTINO-ANDRADE, A. J. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 165-170, 2010.

MARZO, A. M. et al. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. **The Journal of Urology**, v. 160, p. 2381-2392, 1998.

MASON, M. A. et al. Use of nutritional supplements by high school football and volleyball players. **Iowa Orthopedic Journal**, v. 21, p. 43-48, 2001.

MATHUR, M.; SUNDARAMOORTHY, S. Ethnopharmacological studies of *Tribulus terrestris* (Linn). in relation to its aphrodisiac properties. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 1, p. 83–94, 2013.

MCCORMICK, D. L. et al. Influence of N-methyl-N-nitrosourea, testosterone, and N-(4-hydroxyphenyl)-all-trans-retinamide on prostate cancer induction in Wistar-Unilever rats. **Cancer Research**, v. 58, p. 3282–3288, 1998.

MCNEAL, J. E. The Zonal Anatomy of the Prostate. **The Prostate**, v. 2, p. 35-49, 1981.

MeSH. **Alkylating Agents**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000477>. Acesso em 26 de abr. 2017.

MOHD, J. et al. Pharmacological scientific evidence for the promise of *Tribulus terrestris*. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 403-406, 2012.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 560 p.

MORITOMO, T. et al. Tissue culture on Mongolian gerbil's (*Meriones unguiculatus*) malignant melanoma. **Jikken dobutsu. Experimental animals**, v. 40, n. 3, p. 385-388, 1991.

NAWA, Y. et al. Histochemical and cytochemical characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 104, n. 3, p. 249-254, 1994.

NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 319-323, 2005.

NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. Pro-sexual and androgen enhancing effects of *Tribulus terrestris* L.: Fact or Fiction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 345-355, 2016.

NOLAN, C. C.; BROWN, A. W.; CAVANAGH, J. B. Regional variations in nerve cell response to trimethyltin intoxication in Mongolian gerbil. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 81, n. 2, p. 204-212, 1990.

ONCOGUIA. Instituto Oncoguia. Sinais e sintomas do câncer de próstata. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-prostata/1188/289/>. Acesso em 26 de jul. 2017.

OSBOURN, A.; GOSS, R. J. M.; FIELD, R. A. The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1261-1268, 2011.

PEIXOTO, A. R. et al. Gestational and lactational exposition to Di-N-butyl-phthalate (DBP) increases inflammation and preneoplastic lesions in prostate of Wistar rats after carcinogenic N-methyl-N-nitrosourea (MNU) plus testosterone protocol. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 10, p. 1185-1195, 2016.

POKRYWKA, A. et al. Insights into Supplements with *Tribulus Terrestris* used by Athletes. **Journal of Human Kinetics**, v. 41, p. 99–105, 2014.

POLLARD M. The Lobund-Wistar rat model of prostate cancer. **Journal of Cellular Biochemistry - Supplement**, v. 16H, p. 84–8, 1992.

POLLARD, M.; LUCKERT, P. H. Production of autochthonous prostate cancer in Lobund-Wistar rats by treatments with N-nitroso-N-methylurea and testosterone. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 77, n. 2, p. 583-587, 1986.

POLLARD, M.; LUCKERT, P. H.; SNYDER, D. L. The promotional effect of testosterone on induction of prostate-cancer in MNU-sensitized L-W rats. **Cancer Letters**, v. 45, n. 3, p. 209-212, 1989.

POLLARD, M.; LUCKERT, P.H. Autochthonous prostate adenocarcinomas in Lobund Wistar rats: a model system. **Prostate**, v. 11, p. 219–227, 1987.

POPPEL, H. V.; TOMBAL, B. Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements. **Cancer Management and Research**, v. 3, p. 91-100, 2011.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **National Cancer Institute Monographs**, v. 12, p. 1-27, 1963.

PRINS, G. S. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endocrine-related cancer**, v. 15, n. 3, p. 649–656, 2008.

PRINS, G. S. et al. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1089, p. 1–12, 2006.

PRINS, G. S.; KORACH, K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids**, v. 73, p. 233-244, 2008.

PROSSNITZ, E. R.; MAGGIOLINI, M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 308, n. 1-2, p. 32–38, 2009.

QURESHI, A.; NAUGHTON, D. P.; PETROCZI, A. A Systematic Review on the Herbal Extract *Tribulus terrestris* and the Roots of its Putative Aphrodisiac and Performance Enhancing Effect. **Journal of Dietary Supplements**, v. 11, n. 1, p. 64–79, 2014.

RAJPUT, R.; SEHGAL, A. Endocrine manipulations in cancer prostate: A review. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 199–204, 2012.

RHIM, J. S. et al. Malignant Transformation of Human Prostate Epithelial Cells by N-nitroso-N-methylurea. **Cancer Research**, v. 57, p. 576–580, 1997.

ROAIAH, M. F. et al. Prospective analysis on the effect of botanical medicine (*Tribulus terrestris*) on serum testosterone level and semen parameters in males with unexplained infertility. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, p. 1–7, 2016.

ROCHEL, S. S. et al. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: A new rodent model for prostate study. **Anatomical Record**, v. 290, p. 1233–1247, 2007.

ROGERSON, S. et al. The effect of five weeks of *Tribulus terrestris* supplementation on muscle strength and body composition during preseason training in elite rugby league players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 21, n. 2, p. 348–353, 2007.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia**: texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2008. 928 p.

SANCHES, L. D. et al. Protective effect of  $\gamma$ -tocopherol-enriched diet on N-methyl-N-nitrosourea-induced epithelial dysplasia in rat ventral prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, p. 362-372, 2013.

SANDEEP, P. M.; BOVEE, T. F. H.; SREEJITH, K. Anti-androgenic activity of *Nardostachys jatamansi* DC and *Tribulus terrestris* L. and their beneficial effects on polycystic ovary syndrome – Induced rat models. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 13, n. 6, p. 248–254, 2015.

SANTOS, F. C. A. et al. Testosterone Stimulates Growth and Secretory Activity of the Female Prostate in the Adult Gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 370–379, 2006.

SANTOS, F. C. A.; TABOGA, S. R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 3–18, 2006.

SAUDAN, C. et al. Short term impact of *Tribulus terrestris* intake on doping control analysis of endogenous steroids. **Forensic Science International**, v. 178, p. e7-e10, 2008.

SCARANO, W. R. et al. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 1, p. 25-37, 2008.

SCARANO, W. R. et al. Tissue remodeling in Guinea pig lateral prostate at different ages after estradiol treatment. **Cell Biology International**, v. 29, n. 9, p. 778-84, 2005.

SCHWENTKER, V. The gerbil – A new laboratory animal. **Veterinarian**, v. 6, p. 5-9, 1963.

SELMAN, S. H. The McNeal Prostate: a review. **Urology**, v. 68, p. 124-128, 2011.

SHARIFI, N. Mechanisms of Androgen Receptor Activation in Castration-Resistant Prostate Cancer. **Endocrinology**, v. 154, n. 11, p. 4010–4017, 2013.

SHIMIZU, H. et al. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. **British Journal of Cancer**, v. 63, p. 963–966, 1991.

SIMPKIN, A. J. et al. Longitudinal prostate-specific antigen reference ranges: choosing the underlying model of age-related changes. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 25, n. 5, p. 1875–1891, 2016.

SINGH, S.; NAIR, V.; GUPTA, Y. K. Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 1, p. 43–47, 2012.

SU, L. et al. Two new steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 1, p. 38-43, 2009.

SUN, B.; QU, W.; BAI, Z. The inhibitory effect of saponins from *Tribulus terrestris* on Bcap-37 breast cancer cell line in vitro. **Zhong Yao Cai**, v. 26, n. 2, p. 104–106., 2003.

SUN, W. et al. A new steroidal saponin from *Tribulus terrestris* Linn. **Natural Product Letters**, v. 16, n. 4, p. 243-247, 2002.

TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L.; GÓES, R. M. Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 8, p. 946-955, 2009.

TAPLIN, M. E.; Ho, S. M. The Endocrinology of Prostate Cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3467–3477, 2001.

THOMSON, A. A. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. **Reproduction**, v. 121, p. 187-195, 2001.

TINDALL, D. J.; RITTMASER, R. S. The rationale for inhibiting 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes in the prevention and treatment of Prostate Cancer. **The Journal of Urology**, v. 179, p. 1236–1243, 2008.

TUDOR, R. J., SEVERS, N. J., HICKS, R. M. The “promoting” activity of methyl methanesulphonate in rat bladder carcinogenesis. **British Journal of Cancer**, v. 50, p. 63–75, 1984.

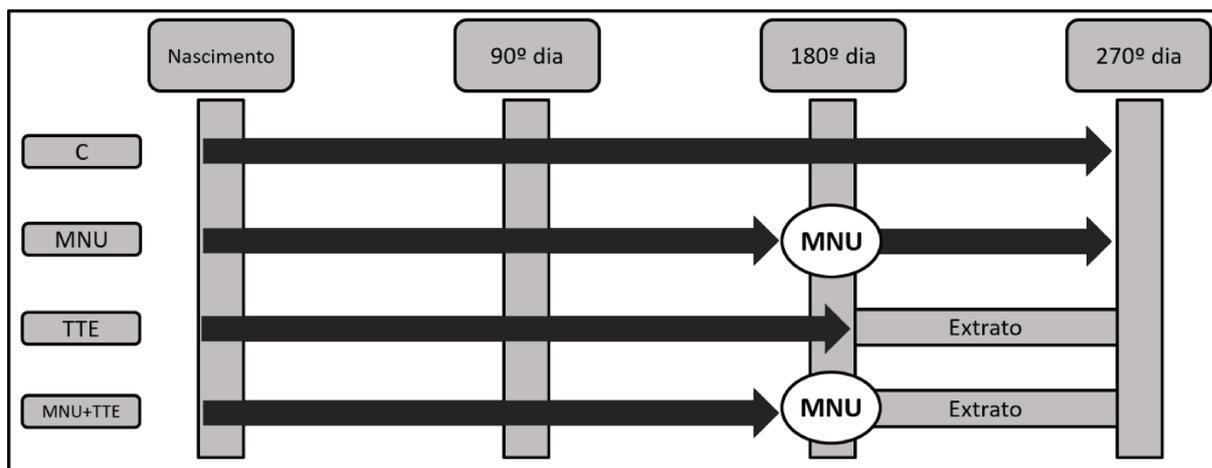
UKANI, M. D.; NANAVATI, D. D.; MEHTA, N. K. A review on the ayurvedic herb *Tribulus terrestris* L. **Ancient Science of Life**, v. 17, n. 2, p. 144–150, 1997.

- VERMEULEN, A et al. Estradiol in elderly men. **Aging Male**, v. 5, n. 2, p. 98-102, 2002.
- WANG et al. Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1417-1422, 1997.
- WEI, S. et al. Terrestrosin D, a steroidal saponin from *Tribulus terrestris* L., inhibits growth and angiogenesis of human prostate cancer in vitro and in vivo. **Pathobiology**, v. 81, p. 123–132, 2014.
- XU, T. H. et al. Two new furostanol saponins from *Tribulus terrestris* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 5-6, p. 419-423, 2008.
- XU, Y. J. et al. Studies on the chemical constituents from *Tribulus terrestris*. **Yao Xue Xue Bao**, v. 36, n. 10, p. 750-753, 2001.
- XU, Y. J. et al. Two new steroidal glucosides from *Tribulus terrestris* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 6, p. 548-553, 2009.
- YABESH, J. E. M.; PRABHU, S.; VIJAYAKUMAR, S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 774-789, 2014.
- YAN, L.; SPITZNAGEL, E. L. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 1155–1163, 2009.
- YOSHIZAWA, K. N-methyl-N-nitrosourea-induced schwannomas in male Sprague-Dawley rats with a literature review of inducible and spontaneous lesions. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 68, n. 7, p. 371-379, 2016.
- YUE, P. Y. K. et al. Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. **Chinese medicine**, v. 2, n. 6, p. 1-21, 2007.
- ZAVIAČIČ, M. **The Female Prostate**: From vestigial Skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate. 1. ed. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press, 1999, 171p.
- ZAZZO, E. et al. Prostate cancer stem cells: the role of androgen and estrogen receptors. **Oncotarget**, v. 7, n. 1, p. 193-208, 2015.

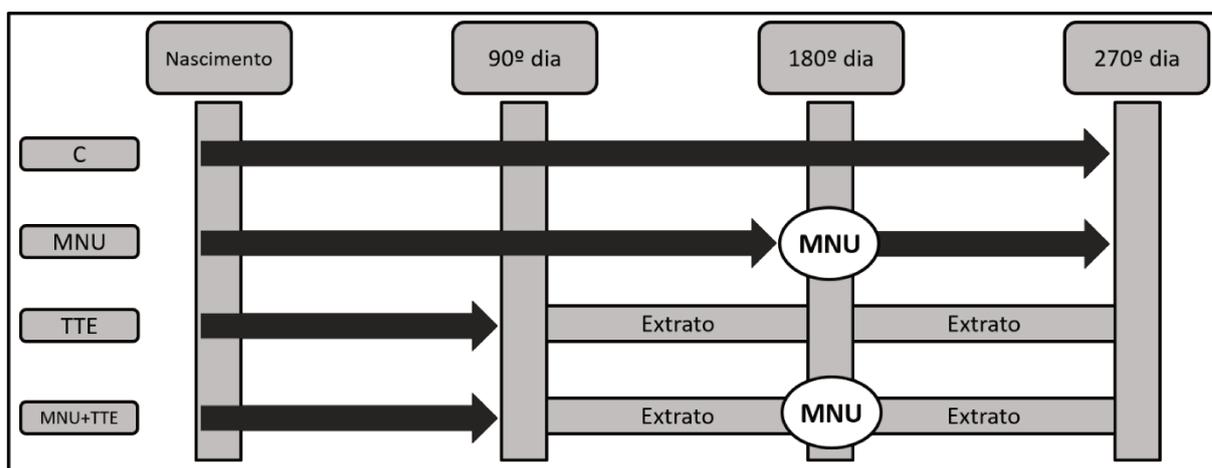
## 10 APÊNDICES

### 10.1 DIAGRAMAS DOS DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 10.1.1 Delineamento experimental apresentado no Capítulo II.



#### 10.1.2 Delineamento experimental apresentado no Capítulo III.



## 11 ANEXOS

11.1 LAUDO DE CONTROLE DE QUALIDADE DO *Tribulus terrestris* UTILIZADO

**FAGRON**

**CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CONTROLE DA QUALIDADE** 9757

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7  
 Autorização Especial de Funcionamento M.S.: 1.20182-2

Página 16/16  
 Impressão 23/11/12 13:03

Insumo: **TRIBULUS TERRESTRIS EXT. SECO**

Lote : LXCJ120503 #5 Origem : China Fabric : 09/05/2012  
 Lote Fab: LXCJ120503 Procedência : China Validade : 08/05/2014  
 Formula : NADA CONSTA PM : N/C  
 DCB : DCI : CAS : SEM DADOS Frac: 612756 21/11/2012

Categoria Terapêutica: FITOTERAPICO

Ensaio	Especificação	Resultado
* DESCRIÇÃO	PÓ FINO MARROM ESCURO, ODOR E SABOR CARACTERÍSTICOS	DE ACORDO
* PERDA P/SECAGEM	MÁXIMO: 5,0%	0,77%
* DENSIDADE	APARENTE	0,5185 g/mL
* DOSEAMENTO	UV-VISÍVEL: MÍNIMO 40% DE SAPONINAS	48,24%
* METAIS PESADOS	MÁXIMO: 20 ppm	0,109 ppm
* GRANULOMETRIA	MALHA 80; PASSA 100%	100%
* MICROBIOLOGIA	CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS: MÁXIMO 10 <sup>3</sup> UFC/g	<10 UFC/g
* MICROBIOLOGIA	CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS: MÁXIMO 10 <sup>3</sup> UFC/g	<10 UFC/g
* MICROBIOLOGIA	PSEUDOMONAS AERUGINOSA: AUSENTE/1g	AUSENTE/1g
* MICROBIOLOGIA	SALMONELLA SP: AUSENTE/1g	AUSENTE/1g
* MICROBIOLOGIA	STAPHYLOCOCCUS AUREUS: AUSENTE/1g	AUSENTE/1g
* MICROBIOLOGIA	COLIFORMES TOTAIS: AUSENTE/1g	AUSENTE/1g
* MICROBIOLOGIA	COLIFORMES FECALIS (E. COLI): AUSENTE/1g	AUSENTE/1g
ENSAIOS ADICIONAIS REALIZADOS PELO FABRICANTE		
MONOGRAFIA	: METODOLOGIA E LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE	
NOMENCLATURA	: TRIBULUS TERRESTRIS EXT. SECO	

**Ficha de Segurança**

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, AO ABRIGO DO CALOR E UMIDADE

Parecer Técnico : DENTRO DOS ITENS PESQUISADOS, O LOTE CUMPRE COM AS ESPECIFICAÇÕES

OBS (\*) Os ensaios assinados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade FAGRON e os demais estão em conformidade com o Certif de Análise do Fat

Dra. Kely Cristina de Lima Oliveira  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF-SP: 52.472

As assinaturas são válidas somente quando acompanhadas de nota fiscal

**Fagron do Brasil Farmacêutica Ltda.**

Rua: Jurupari, 775 - Jd. Oriental - São Paulo - SP Cep 04348-070  
 Tel.: 11 5033-3700 - Fax: 11 5033-3711 - fagron@fagron.com.br / www.fagron.com.br / www.compoundingmatters.com

## 11.2 CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

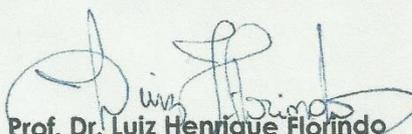
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do fitoterápico *Tribulus terrestris* sobre a próstata do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*)", registrada com o nº. 54/2011 - CEUA, sob a responsabilidade do Professor Doutor Sebastião Roberto Taboga, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou de ensino), encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), do IBILCE/UNESP, em reunião de 29 de fevereiro de 2012.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01 de março de 2012 a 31 de agosto de 2017
Espécie/linhagem/Raça	Gerbilo da Mongólia ( <i>Meriones unguiculatus</i> )
Nº de animais	96 (noventa e seis)
Peso/Idade	60g / 270 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério de criação do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 17 de abril de 2017.

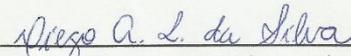
  
**Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo**  
Presidente da CEUA

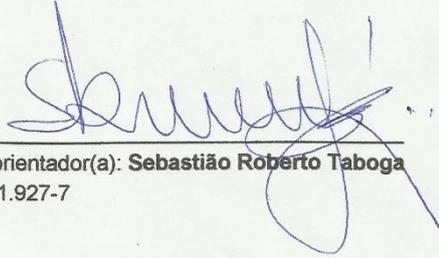
## 11.3 DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

## Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **EFEITOS DO FITOTERÁPICO *Tribulus terrestris* SOBRE A PRÓSTATA DO GERBILO DA MONGÓLIA (*Meriones unguiculatus*)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 08 de agosto de 2017

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **Diego Augusto Lopes da Silva**  
RG n.º 33.535.028-8

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Sebastião Roberto Taboga**  
RG n.º 13.591.927-7