

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO DECLÍNIO REPRODUTIVO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM *TRIBULUS TERRESTRIS* L. NO COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS SUBMETIDOS AO TESTE DO NADO FORÇADO

*Investigation of the effect of reproductive decline and supplementation with *Tribulus terrestris* L. on the behavior of Swiss mice submitted to the forced swimming test*

Lucas R. Moreira¹
Marcia C. L. Marcellino¹
Thaina V. Bertozzo¹
Jonatas M. A. Angelo¹

¹ USC – Universidade do Sagrado Coração

MOREIRA, Lucas R. *et al.* Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

RESUMO

Introdução: a redução dos esteroides sexuais ocasionada pelo hipogonadismo se associa a depressão. Tratamentos alternativos com plantas medicinais como o extrato do *Tribulus terrestris* (TT) tem sido frequentemente usado por pessoas nesta condição. **Objetivo:** este estudo teve por objetivo investigar a influência do declínio de

Recebido em: 09/10/2017
Aceito em: 12/01/2018

testosterona, da suplementação com TT e propionato de testosterona no comportamento de animais. **Método:** foram utilizados 40 camundongos da linhagem *Swiss*, machos, divididos em quatro grupos. Os grupos controle e castrado receberam veículo aquoso; o grupo TT recebeu 10 mg/kg do extrato da planta e o grupo propionato de testosterona foi tratado com 20 mg/kg deste fármaco. A avaliação comportamental foi feita pelo teste do nado forçado. Após trinta dias de tratamento, foi coletado sangue para dosagem de testosterona livre. **Resultado e Discussão:** os resultados evidenciaram efeito antidepressivo significativo nos animais castrados e suplementados com propionato de testosterona. Houve também significância no efeito depressivo nos animais tratados com TT; redução significativa na concentração de testosterona nos animais castrados e aumento significativo nos animais do grupo TT e propionato de testosterona. **Conclusão:** conclui-se que a castração, suplementação com TT e propionato de testosterona apresentaram suposta capacidade de alterar o comportamento e modificar as concentrações sérias de testosterona.

Palavras-chave: Depressão. Testosterona. *Tribulus terrestris*.

ABSTRACT

Introcution: *the reduction of sexual steroids caused by hypogonadism is associated with depression. Alternative treatments with medicinal plants like Tribulus terrestris (TT) extract have often been used by people in this condition.* **Objective:** *this study aimed to investigate the influence of testosterone decline, supplementation with TT and testosterone propionate on animal behavior.* **Method:** *fourty Swiss male mice were divided into four groups. The control and castrated groups received aqueous vehicle; the TT group received 10 mg / kg of the plant extract and the testosterone propionate group was treated with 20 mg / kg of this drug. Behavioral assessment was performed by the forced swim test. After 30 days of treatment, blood was collected for free testosterone dosing.* **Results and Discussion:** *the results showed a significant antidepressant effect in castrated animals supplemented with testosterone propionate. There was also significance in the depressive effect in animals treated with TT; significant reduction in the concentration of testosterone in castrated animals and a significant increase in the animals of the TT group and testosterone propionate.* **Conclusion:** *it was concluded that castration, supplementation with TT and testosterone propionate*

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

presented a supposed capacity to alter the behavior and modify serum concentrations of testosterone.

Keywords: *Depression. Testosterone. Tribulus terrestris.*

INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno do humor que influencia na ação, pensamento e convívio social. Pode estar associada ao envelhecimento, devido ao declínio funcional dos neurônios. Estas células também se modificam perante as situações vivenciadas. Com prevalência duas vezes maior em mulheres, o risco de desenvolver a doença durante a vida é de 10 a 20% na população (HIRSCHFELD, 2002).

As causas da depressão são baseadas em hipóteses, das quais as mais aceitas são a hipótese das monoaminas, onde é proposto que todo o sistema neurotransmissor trimonoaminérgico pode estar com disfunções em diversos circuitos cerebrais. Outra hipótese se refere a alterações funcionais nos receptores monoaminérgicos (RANG et al., 2007; STAHL, 2010).

Indicadores biológicos auxiliam no diagnóstico da depressão, como a quantidade plasmática de cortisol ou hidrocortisona, que é elevada em pacientes portadores de depressão unipolar, e a presença ou ausência de metabólitos de neurotransmissores no líquido e urina. (UMPHRED, 2004)

O tratamento farmacológico da depressão é feito pelas classes de fármacos conhecidos como: antidepressivos tricíclicos, que inibem a recaptção da serotonina, noradrenalina e dopamina; inibidores seletivos de recaptção, cujo mecanismo consiste em inibir de forma seletiva a recaptção de uma ou duas aminas biogênicas; inibidores da enzima monoaminaoxidase (IMAO) e antidepressivos atípicos, cujo mecanismo de ação consiste em aumentar os níveis de dopamina e serotonina. Os efeitos terapêuticos geralmente surgem entre duas a quatro semanas de tratamento. Tais fármacos possuem efeitos adversos como agitação, acatisia e disfunção sexual. (STAHL, 2010; GOLAN, 2014; STAHL, 1997)

A testosterona é um hormônio esteroide produzido pelas células de Leydig localizadas no interstício dos túbulos seminíferos dos testículos. O hipotálamo e a glândula hipófise anterior regulam a produção hormonal de testosterona ocorrida nos testículos. A testosterona aumenta a liberação do hormônio do crescimento; estimula a captação de nitrogênio, potássio, magnésio, fósforo, sódio e enxofre

pelas células; aumenta a taxa metabólica basal das fibras musculares esqueléticas e possui ação anabolizante e virilizante. (NELSON et al., 2006; GRIFFIN et al., 2010; FREYBERGER et al., 2009; GINZBURG et al., 2010; SATTLER et al., 2009). A partir dos sessenta anos de idade os homens começam a sentir os efeitos do hipogonadismo tardio ou andropausa, devido ao declínio de testosterona sérica. Os sintomas são perda de força, de massa muscular, desmineralização óssea, dislipidemia, acúmulo de gordura visceral, diminuição da taxa metabólica basal, diminuição da produção espermática, redução da libido, disfunção erétil e alteração de humor. Tais sintomas alteram a qualidade de vida do homem na fase senil, os quais cada vez mais buscam suplementação com o hormônio sintético, que possui diversos efeitos prejudiciais. (ANDRADE JUNIOR et al., 2009; MYERS et al., 2003)

Plantas medicinais como o extrato de *Tribulus terrestris* L. da família botânica *Zygophyllaceae* R. Br. representam na atualidade uma alternativa para o incremento de testosterona, no entanto, suas propriedades ainda não são completamente elucidadas. (GAUTHAMAN, 2008). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar o suposto efeito comportamental da castração, da suplementação com fármaco análogo à testosterona (propionato de testosterona) e do extrato de *Tribulus terrestris* em camundongos suíços submetidos ao teste comportamental do nado forçado.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 40 camundongos da linhagem *Swiss*, machos e com 60 dias, providos do Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Durante o período experimental, os animais permaneceram acondicionados em gaiolas de polietileno, contendo cada uma 10 animais. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*. O ambiente de manutenção foi mantido com ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura entre 22 a 25°C, constantemente limpo e arejado.

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Sagrado Coração – USC e recebeu o parecer número 9871190216 registrado em 19/02/2016.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

Distribuição dos grupos

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de experimento: Grupo Controle (GC - n=10): durante o procedimento recebeu por gavagem 0,2 mL de veículo aquoso; Grupo Castrado (GCA - n=10): durante o procedimento recebeu por gavagem 0,2 mL veículo aquoso; Grupo Testosterona (GT - n=10): durante o procedimento recebeu 20 mg/kg de propionato de testosterona (dose para um indivíduo adulto que foi convertida para o peso médio dos animais), dissolvida em veículo aquoso. A administração foi feita por gavagem num volume de 0,2 mL; Grupo *Tribullus terrestris* (GTT - n=10): foram tratados com 10 mg/Kg (Gauthaman e Ganesan, 2008) do extrato das sementes do *Tribulus terrestris* L. dissolvidos em veículo aquoso, concentrado num volume de 0,2 mL, administrado por gavagem. O tratamento foi realizado por 30 dias.

O extrato seco das sementes do *Tribulus terrestris* L. foi adquirido numa farmácia de manipulação da cidade de Bauru que forneceu o laudo de autenticação e controle de qualidade do mesmo. (ANEXO B).

Orquiectomia bilateral dos camundongos

Segundo Andrade (2006), o camundongo torna-se apto à reprodução aos 60 dias de idade, no entanto, os efeitos hormonais iniciais já estão presentes em ambos os sexos ao redor dos 30 dias de idade. Nos machos a ação hormonal é evidenciada pela descida e aumento dos testículos. Diante do exposto, a orquiectomia bilateral foi realizada quando os camundongos completaram 60 dias. Apenas 10 animais (Grupo castrado) foram submetidos ao procedimento.

Teste comportamental

Para o teste do nado forçado, de acordo com o modelo proposto por Porsolt (1977), os animais passaram por um período de adaptação de 10 dias, tendo seu primeiro contato com a água. Cada sessão de adaptação durou 15 minutos e foi dividida de acordo com os grupos do estudo. Terminada a adaptação, os animais foram expostos ao experimento, onde foram colocados num tanque com água climatizada (uso de termostato) suficiente para que o animal não conseguisse tocar o fundo do mesmo, sendo obrigado a nadar. Duas vezes por semana os animais nadavam em duplas por 5 minutos, tendo todas

as sessões gravadas para análise dos parâmetros: tempo de escalada ou tentativa de fuga, tempo de nado e tempo de imobilidade. A temperatura da água foi cuidadosamente mensurada com auxílio de termômetro para manter-se em 30 +/- 2° C. Após nadarem os animais eram secados e devolvidos a gaiola.

Determinação da concentração sérica de testosterona livre

Para dosagem de testosterona sérica os animais foram anestesiados com dose letal de Tiopental (150mg/Kg) e Lidocaína (10mg/Kg), sendo realizada a punção cardíaca para obtenção do sangue, que foi encaminhado ao Laboratório de Análises Clínicas da Fundação Veritas – Bauru/ São Paulo, localizado no campus da Universidade do Sagrado Coração.

Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados pelo teste paramétrico *T-Student* ($p < 0,05$) através do software Graphpad prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta a comparação das médias de tempo (em segundos) do tempo de escalada ou tentativa de fuga, nado e imobilidade entre o grupo controle (GC) e demais grupos em estudo (Grupo Castrado, *Tribulus* e Testosterona, respectivamente). Em relação ao tempo de escalada, os grupos castrado e suplementado com propionato de testosterona apresentaram tempo significativamente maior quando comparado ao controle. Em relação ao tempo de nado, o grupo suplementado com o extrato do *Tribulus terrestris* L. executou menor tempo em relação ao controle, sendo esta redução significativa ($p < 0,05$). Quanto ao tempo de imobilidade, não foi evidenciada diferença significativa dos grupos quando comparados ao controle.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

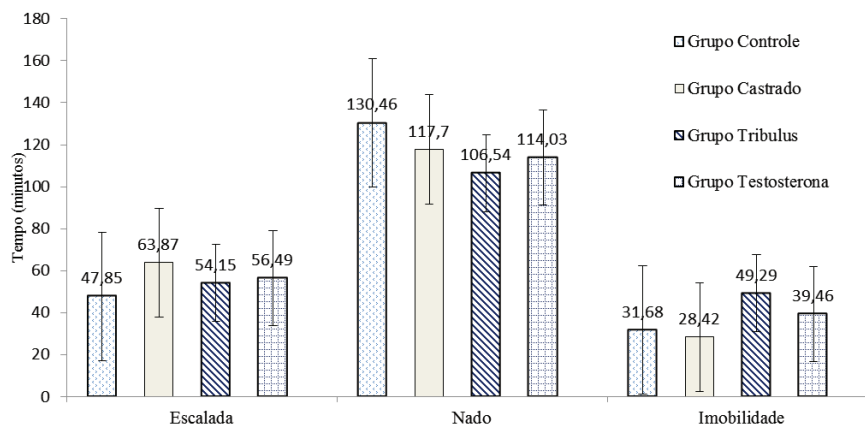


Figura 1 - Comparação das médias de tempo de escalada, nado e imobilidade entre o grupo controle (GC) e grupos castrado (GC), *Tribulus* (GTT) e Testosterona (GT). * Valores significativos ($p < 0,05$) segundo Teste *T-Student*.

Segundo Duman e Monteggia (2006), o teste do nado forçado, desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977) representa uma das mais importantes ferramentas de avaliação da atividade antidepressiva de fármacos. No presente estudo foram avaliados três parâmetros deste teste durante o nado realizado pelos camundongos: tentativa de fuga ou escalada; tempo de nado e tempo de imobilidade.

Os animais dos grupos castrado e do suplementado com propionato de testosterona apresentaram aumento significativo no tempo de escalada, sugerindo de forma antagônica, que a redução da testosterona endógena promovida pela castração, assim como a suplementação com fármaco análogo à testosterona estejam supostamente correlacionadas a esta alteração, sendo interpretada como efeito antidepressivo.

Segundo Leibenluft (1999), o impacto dos hormônios sexuais sobre a função psíquica é frequentemente associado à manifestação dos transtornos mentais. Fases de flutuações hormonais estão associadas a sintomas depressivos ou ansiogênicos. (Soares et al., 2001). Diante do exposto, os resultados apresentados quanto aos grupos castrado e suplementado com propionato de testosterona corroboram com estas citações.

Um estudo realizado por Seidman e Rabkin (1998) observou cinco homens com idade entre 34 a 50 anos e que não obtiveram melhora da depressão após o uso de paroxetina e fluoxetina. Ambos apresentavam baixos níveis de testosterona. Após serem tratados com enantato de testosterona por via intramuscular e os antidepressivos por oito semanas, apresentaram melhora significativa do humor. Os

resultados evidenciados no presente estudo no grupo suplementado com propionato de testosterona corroboram com esta citação.

Quanto ao aumento do tempo de escalada no grupo castrado, este possível evento antidepressivo ou ansiogênico supostamente está relacionado à intervenção cirúrgica. Para Juan (2007) a ansiedade de curto prazo ou imediata visa preparar o organismo para lutar ou fugir do perigo. O excesso de tais sensações pode desencadear problemas cognitivos em cada indivíduo, fazendo-os perceber a necessidade de um comportamento de ajuste mediante o ato de enfrentar o estresse e a ansiedade causados pelo desconhecido, levando os animais a adaptar-se as novas situações. No presente estudo, fatores como a anestesia geral, a dor e incômodo do corte (mesmo com os analgésicos), até a cicatrização, representa um período diferencial aos demais grupos e supostamente propício ao efeito ansiogênico evidenciado neste grupo de experimento.

De acordo com Cryan et al., (2002) a redução no tempo do nado dos animais deve ser interpretado como prejuízo comportamental, ou seja, redução da atividade neuronal que simula o ocorrido na depressão, onde o animal desenvolve comportamento passivo reduzindo sua habilidade de enfrentar situações estressoras. No presente estudo, os camundongos suplementados com extrato de *Tribulus terrestris* apresentaram maior permanência neste estágio em comparação aos demais grupos, supondo que componentes ativos desta planta apresentem possível efeito depressivo. Esta redução foi significativa e sugere que a planta tenha capacidade de interferir neste parâmetro.

Um estudo realizado com ovelhas que receberam extrato de alcaloides do *Tribulus terrestris* L. na dose de 54 mg/kg evidenciou perda parcial da motricidade dos membros dos animais que também desenvolveram marcha cambaleante. Esta mesma publicação sugeriu que os alcaloides do *Tribulus terrestris* L. interagem de forma irreversível com material genético dos neurônios. (Bourke et al., 1992). De acordo com publicações feitas pela European Food Safety Authority – EFSA (2012), 40 a 80mg do extrato seco do *Tribulus terrestris* L. apresenta em sua composição química beta-alcaloides. Uma avaliação recente realizada pela Universidade Técnica da Dinamarca – DTU, (2014) evidenciou que o extrato de *Tribulus terrestris* L. apresenta capacidade de provocar sérios efeitos tóxicos sobre o fígado e sistema nervoso central. Esta citação corrobora com a hipótese do presente estudo de que componentes da planta apresentam capacidade de alterar a função neuronal, ocasionando possível redução funcional dos neurônios.

A figura 2 apresenta a média dos níveis séricos de testosterona obtidos no presente estudo. Foi evidenciada redução significativa de

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

testosterona livre no grupo castrado e aumento significativo deste hormônio nos grupos suplementados com o extrato de *Tribulus terrestris* e propionato de testosterona.

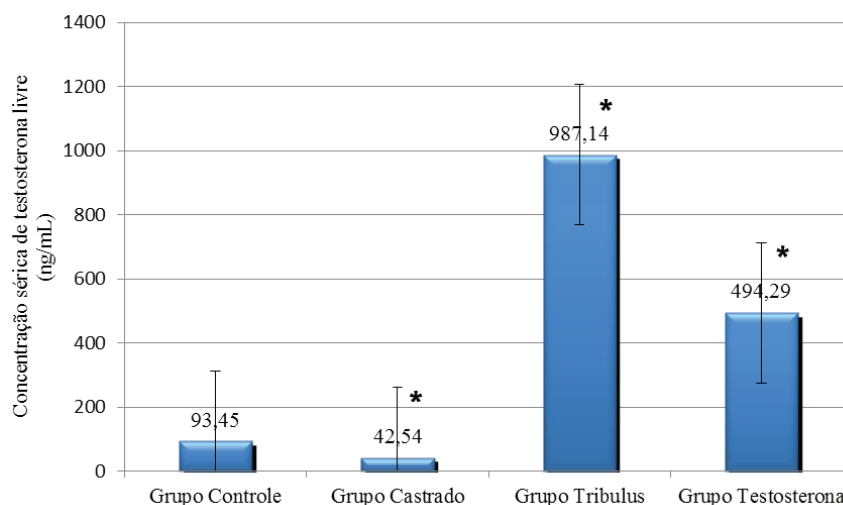


Figura 2 - Comparação das médias de testosterona sérica entre os grupos de experimento. Teste *T-Student* ($p < 0,05$) * valores estatisticamente significativos.

Segundo Casquero (2005), camundongos submetidos à castração não apresentam quantidades suficientes de andrógenos na circulação para desempenhar suas funções. Os dados apresentados na Figura 2 em relação ao grupo castrado, corroboram com esta citação.

Em contrapartida, o presente estudo evidenciou aumento significativo de testosterona em relação aos grupos *Tribulus* e Propionato de testosterona (grupo testosterona) quando comparados ao grupo controle. De acordo com Gauthaman e Ganesan (2008), publicações afirmam que o extrato do *Tribulus terrestris* L. apresenta capacidade de aumentar os níveis séricos dos hormônios luteinizante (LH) e testosterona em animais com disfunção erétil. Um dos componentes químicos desta planta é conhecido como protodioscina que supostamente se converte em deidroepiandrosterona ou DHEA. (Gama et al., 2014). A enzima 3-beta-hidroxiesteroide (3β -HSD) converte o DHEA em androstenediona, sendo este hormônio precursor de estradiol e testosterona. (Reine, 2007). O aumento de testosterona evidenciado no grupo suplementado com *Tribulus terrestris* do presente estudo corrobora com estas citações.

O propionato de testosterona é um fármaco que repõe este hormônio, ou seja, o fármaco se transforma em testosterona. Apresenta ação imediata e de curta duração. (Santos, 2003). O aumento signifi-

ficativo de testosterona livre encontrado no presente estudo supostamente está associado a esta suplementação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que a castração e a suplementação com propionato de testosterona causaram efeito antidepressivos nos animais. A castração supostamente ocasionou ansiedade em decorrência dos efeitos pós-cirúrgicos, enquanto que a testosterona exógena gerou variação hormonal ocasionado suposta estimulação neuronal; o extrato do *Tribulus terrestris* L. mostrou suposto efeito depressivo que pode estar associado à presença de alcaloides em sua constituição química; quanto aos níveis séricos de testosterona, a castração reduziu significativamente a dosagem deste hormônio, enquanto que os animais suplementados com TT e propionato de testosterona apresentaram aumento significativo. No caso do extrato vegetal a literatura sugere que compostos químicos do TT sejam metabolizados e convertidos em testosterona livre.

Novas pesquisas que busquem avaliar a atuação de componentes químicos isolados do extrato do TT e que sejam realizados por mais tempo tornam-se necessários para elucidar os resultados apresentados neste experimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a professora Marcia Clélia Leite Marcellino, pois a partir do amor que demonstra por seu trabalho inspirou-me a seguir seus passos. Graças a ela me descobri no mundo da pesquisa e dele não pretendo sair. Eternamente grato também por sua orientação, seus ensinamentos e seu carinho para com os alunos. Você foi essencial para que este trabalho acontecesse.

Agradeço aos meus pais por todo o suporte oferecido.

Agradeço aos coautores Thainá Bertozzo e Jonatas Angelo que juntos me acompanharam nessa jornada, compartilhando conhecimentos e aprendendo mais a cada dia.

Agradeço as técnicas dos laboratórios de microscopia e biociências, Fabiane e Ligia, por todo o suporte oferecido no período de experimento.

Agradeço aos professores Geraldo Rosa e Rodrigo Carvalho por tão generosamente cederem o tanque e o espaço para realização de parte do processo experimental.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

MOREIRA, Lucas R. *et al.* Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

Agradeço a Dra. Solange Franzolin pelo auxílio na análise estatística. Agradeço ao Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC, em especial, a professora Dulce Helena Jardim Constantino, Alexandre Braz e Brendo Henrique.

Ao apoio cedido pela Universidade do Sagrado Coração- USC.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE JUNIOR, E. S. de.; CLAPAUCH, R.; BUKSMAN, S. 2009. Short term testosterone replacement therapy improves libido and body composition. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , n. 8, v. 53, p. 996-1004, Nov. 2009
- ANDRADE, M.C.R. 2002. Criação e Manejo de Primatas não-humanos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de Laboratório criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006, 388 p..
- BOURKE C.A., STEVENS, G.R., CARRIGAN, M.J. 1992. Locomotor effects in sheep of alkaloids identified in Australian *Tribulus terrestris*. **Aust Vet J**. New South Wales, n. 7, v. 69, p. 163-5, 1992.
- CASQUERO, A.C. 2005. Efeitos de hormônios sexuais masculinos sobre o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas e expressão da CETP em camundongos geneticamente modificados sedentários e exercitados. São Paulo. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- CRYAN J.F.; MARKOU A.; LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**. Amsterdam, n.5, v.23, p. 238-45, 2002.
- DTU -UNIVERSIDADE TÉCNICA DE DINAMARCA - DTU. Risikovurdering af *Tribulus terrestris* I fire kosttilskud fra Bodystore. dk., Instituto Nacional de Alimentación, 2014.
- DUMAN R.S; MONTEGGIA L.M.. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry**. n. 12, v.59, p. 1116-27, 2006.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. 2012. Scientific report: Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. The EFSA Journal.
- FREYBERGER, A. E SHLADT, L.. Evaluation of rodent Hershberger bioassay on intact juvenile males- Testing of coded chemicals and supplementary biochemical investigations. **Toxicology**. Amsterdam, n. 2, v. 262, p. 114-20, 2009.
- GAMA, C.R., LASMAR ,R., GAMA,G.F., ABREU, C.S., NUNES, C.P., GELLER, M, et al. Clinical Assessment of *Tribulus terrestris*
- MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementa o com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos su os submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

MOREIRA, Lucas R. *et al.* Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.

Extract in the Treatment of Female Sexual Dysfunction. **Clin Med Insights Womens Health**. Auckland, n. 7, v. 22, p. 45-50, 2014.

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**. Stuttgart, n. 1-2, 15, p. 44-54, 2008.

GINZBURG, E. *et al.* Long-term safety of testosterone and growth hormone supplementation: a retrospective study of metabolic, cardiovascular, and oncologic outcomes. *Journal of Clinical Medicine Research*. Québecq, n 4, v. 2. p. 159–166, 2010.

GOLAN, D.E. 2014. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. Rio de Janeiro: GEN. 2014

GRIFFIN, D. K. *et al.* Transcriptional profiling of luteinizing hormone receptor- deficient mice before and after testosterone treatment provides insight into the hormonal control of postnatal testicular development and leydig cell differentiation. **Biology of reproduction**. Champaign, n. 6, v. 82, p. 1139–1150, 2010.

HIRSHFELD, R.M.A. *et al.* Partial Response and Nonresponse to Antidepressant Therapy: Current Approaches and Treatment Options. **The Journal of Clinical Psychiatry**. n. 9, v. 63, p. 826-37, 2002.

JUAN, K. O. Impacto da cirurgia e os aspectos psicológicos do paciente: uma revisão. **Psicol. hosp.**, São Paulo, n. 1, v. 5, p. 48-59, 2007

LEIBENLUFT, E. *et al.* Gender Differences in Mood and Anxiety Disorders. From Bench to Bedside. **Review of Psychiatry**; Volume 18 Washington: American Psychiatric Association Publishing, 1999.

MYERS, J. B.; MEACHAM, R. B. Androgen replacement therapy in the aging male. **Reviews in Urology**. Mercer Island, n. 4, v. 5, p. 216-26, 2003..

NELSON, D.L., COX, M.M. 2006. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. London, n. 266, p. 730–732, 1977.

RANG, H. P.; DALE, M. M., FLOWER, R. J. 2007. **Farmacologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier,

REINE N. J. Medical Management of Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism: Mitotane versus Trilostane. **Clin Tech Small Anim Pract**. Philadelphia, n. 1, v. 22, p. 18-25, 2007.

SANTOS, A. M.. 2003. **O Mundo Anabólico: Análise do Uso de Esteroides Anabólicos no Esportes**. Barueri, SP: Manole.

SATTLER, F. R. et al. Testosterone and growth hormone improve body composition and muscle performance in older men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. Springfield, n. 6, v. 94, p. 1991-2001, 2009.

SEIDMAN, S.N, RABKIN, J.G. Testosterone replacement therapy for hypogonadal men with SSRI-refractory depression. **J Affect Disord.**, Amsterdam, n.. 2-3, v. 48, p. 157-61, 1998..

SOARES, C.N., COHEN, L.S., OTTO, M.W., HARLOW,B.L. Characteristics of women with Premenstrual Dysphoric Disorder (PMDD) who did or did not report history of depression. **J Womens Health Gend Based Med.**, Larchmont, n. 9, v. 10, p. 873-8, 2001.

STAHL, S.M. **Psychopharmacology of Antidepressants**. London: Martin Dunitz, 1997.

STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

UMPHRED, D. A. **Reabilitação Neurológica**. 4ª ed. São Paulo: Manole Ltda, 2004.

MOREIRA, Lucas R. et al. Investigação do efeito do declínio reprodutivo e da suplementação com Tribulus terrestris L. no comportamento de camundongos suíços submetidos ao teste do nado forçado. **SALUSVITA**, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1067-1080, 2017.