

ESTUDO HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SUIÇOS MACHOS SUPLEMENTADOS COM PROPIONATO DE TESTOSTERONA E *TRIBULUS TERRESTRIS* L.

Histological study of testicles of mice swiss males supplements with testosterone propionate and Tribulus terrestris L.

Lucas Roberto Moreira¹

Thainá Valente Bertozzo¹

Jonatas Medeiros de Almeida Angelo¹

Marcia Clélia Leite Marcellino¹

¹Universidade do Sagrado Coração – Bauru/SP – Brasil

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

RESUMO

Introdução: o declínio sérico de testosterona decorrente da idade afeta a qualidade de vida do homem, que busca meios para tratamento que não possuam tantos efeitos adversos como a testosterona sintética, como o extrato da planta *Tribulus terrestris* L. (TT). **Objetivo:** estudar a histologia dos testículos de camundongos suíços suplementados com propionato de testosterona e extrato de TT. **Métodos:** o

Recebido em: 03/05/2018

Aceito em: 27/08/2018

procedimento utilizou 30 camundongos suíços machos divididos em 3 grupos, onde o grupo controle recebeu veículo aquoso durante o experimento. O grupo testosterona recebeu 20mg/kg do fármaco e o grupo TT recebeu 10 mg/kg do extrato das flores da planta. **Resultados e Discussão:** a região epididimária foi visualizada com características de normalidade, mostrando epitélio pseudo-estratificado ciliado, intercalado por tecido muscular liso. Nos grupos controle e testosterona foi evidenciado a presença de espermatozoides no centro dos ductos. O alto incremento de testosterona sérica causado pela suplementação com o TT possivelmente leva a um mecanismo de feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise, fazendo com que o mesmo não secrete os hormônios necessários para a síntese de testosterona endógena e sequente produção espermática. **Conclusão:** o uso de TT pode causar azoospermia.

Palavras-chave: Epidídimo. Testosterona. *Tribulus terrestris* L.

ABSTRACT

Introduction: *age-related serum testosterone decline affects man's quality of life, which seeks treatment means that do not have as many adverse effects as synthetic testosterone, such as Tribulus terrestris L. (TT) extract.* **Objective:** *to study the histology of the testes of Swiss mice supplemented with testosterone propionate and TT extract.* **Methods:** *the procedure used 30 male Swiss mice divided into 3 groups, where the control group received an aqueous vehicle during the experiment. The testosterone group received 20 mg / kg of the drug and the TT group received 10 mg / kg of the plant extract.* **Results and Discussion:** *the epididymary region was visualized with characteristics of normality, showing ciliated pseudo-stratified epithelium, interspersed by smooth muscle tissue. In the control and testosterone groups the presence of spermatozoa was evidenced in the center of the ducts. The high increase of serum testosterone caused by supplementation with TT possibly leads to a negative feedback mechanism in the hypothalamic-pituitary axis, causing it not to secrete the hormones necessary for the synthesis of endogenous testosterone and subsequent sperm production.* **Conclusion:** *the use of TT may cause azoospermia.*

Keywords: *Epididymis. Testosterone. Tribulus terrestris L.*

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus Terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

MOREIRA, Lucas
Roberto *et al.*
Estudo histológico
dos testículos de
camundongos suíços
machos suplementados
com propionato de
testosterona e *Tribulus
Terrestris* L. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 37, n. 3,
p. 633-643, 2018.

A constante busca do homem pela melhora da qualidade de vida na fase senil é fato. Diante do exposto, ocorre a grande procura por reposição hormonal, uma vez que a testosterona – hormônio esteroi- dal que entra em queda constante de acordo com a idade – é funda- mental para a saúde masculina. (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2009; FREYBERGER *et al.*, 2009; GINZBURG *et al.*, 2010; GRIFFIN, 2010; NELSON *et al.*, 2006; SATTLER *et al.*, 2009)

A testosterona sintética, apesar de eficaz na suplementação, tam- bém possui severos efeitos adversos, como atrofia testicular irrever- sível e possível azoospermia (ausência de espermatozoides) (GIL- MAN *et al.*, 1996).

Com a evolução constante da ciência, buscaram-se novas alternati- vas para tratamentos das mais diversas condições por meio de novos princípios ativos, não antes utilizados para tais finalidades.

A medicina popular chinesa traz por sua sabedoria que a planta *Tribulus terrestris* L. é um afrodisíaco natural, capaz de aumentar os níveis de testosterona sérica, aumentar o desejo e vigor sexual, além de ajudar no tratamento de infertilidade e disfunção erétil (GAU- THAMAN, 2008).

Sendo assim, este estudo teve por objetivo analisar a histologia dos testículos de animais suplementados com o extrato da espécie vegetal *Tribulus terrestris* L. e o propionato de testosterona, droga utilizada como tratamento padrão a disfunções hormonais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos

Este projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sagrado Coração. Seu parecer foi número 9871190216.

Para o estudo, utilizou-se trinta camundongos suíços machos, com 120 dias de idade. Os mesmos foram cedidos pelo biotério da Universidade do Sagrado Coração, onde foram acondicionados em gaiolas de polietileno em ambiente entre 22 e 25°C, com ciclo claro- escuro de 12 horas, limpo e bem ventilado.

Os animais foram divididos em três grupos, sendo o primeiro chamado de controle, que recebeu durante o experimento um veículo aquoso para simular a ingesta de suplementação realizada nos outros grupos. O segundo grupo recebeu o nome de Grupo Tribulus e rece- beu o extrato das flores do *Tribulus terrestris* L. na dosagem de 10 mg/kg (GAUTHAMAN, 2008). O terceiro e último grupo foi cha-

mado de Grupo Testosterona e recebeu o propionato de testosterona na dosagem de 20 mg/kg (BulasMed, 2014). Ambos os tratamentos foram feitos por gavagem durante 30 dias. O volume de concentração foi de 0,2 ml/dia.

O extrato aquoso das flores da planta *Tribulus terrestris* L. foi adquirido de uma farmácia especializada em manipulação da cidade de Bauru-SP, que forneceu o laudo de qualidade e vistoria do mesmo.

Coleta dos testículos

Os animais foram eutanasiados com dose letal de Tiopental (150mg/Kg) e Lidocaína (10mg/Kg) e os testículos retirados e enviados para o laboratório de histologia da Universidade do Sagrado Coração, onde foram emblocados em parafina e os cortes foram realizados. Também, no mesmo, foi realizada a coloração das lâminas por Hematoxilina-Eosina (HE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histológica do testículo em relação ao grupo controle mostrou que os grupos suplementados com *Tribulus terrestris* L. e com propionato de testosterona não obtiveram diferenças histológicas, com exceção de que no grupo TT não foi observada a presença de espermatozoides em nenhum dos animais na região central dos tubos. A figura 1 mostra o testículo dos animais do grupo controle, em que se observa todos os padrões de normalidade para este tecido. Na figura 3 observa-se o corte histológico do testículo do grupo suplementado com *Tribulus terrestris* L., que também apresenta padrões de normalidade, entretanto mostra ausência de espermatozoides. A figura 2 mostra o testículo do grupo suplementado com propionato de testosterona, nela, todos os parâmetros de normalidade foram observados, inclusive a presença de espermatozoides.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus Terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

MOREIRA, Lucas
Roberto *et al.*
Estudo histológico
dos testículos de
camundongos suíços
machos suplementados
com propionato de
testosterona e *Tribulus
Terrestris* L. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 37, n. 3,
p. 633-643, 2018.

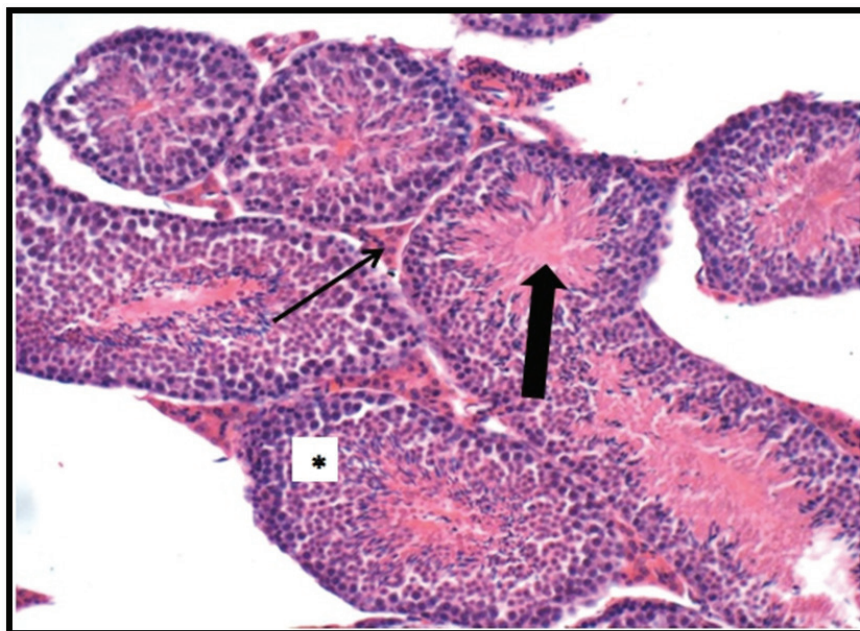


Figura 1 - Grupo Controle – Região epididimária, com características de normalidade. Epitélio pseudo-estratificado ciliado (*), intercalado por tecido muscular liso (seta fina). Na região central dos ductos, observam-se espermatozoides (seta grossa). Hematoxilina-eosina, aumento de 20x.

Fonte: elaborado pelo autor.

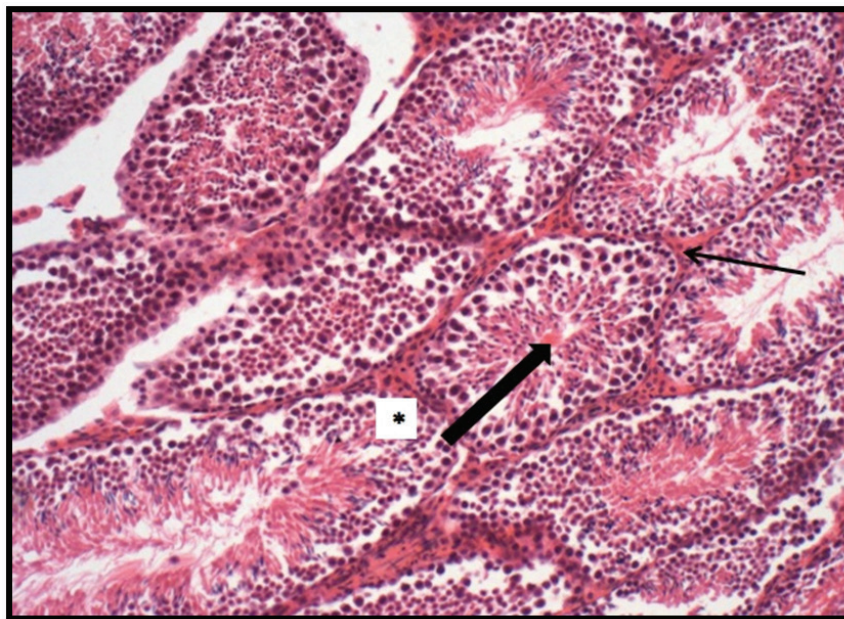


Figura 2 - Grupo Testosterona – Epitélio pseudo-estratificado ciliado (*), intercalado por tecido muscular liso (seta fina). Na região central dos ductos, observam-se espermatozoides (seta grossa). Hematoxilina-eosina, aumento de 20x.

Fonte: elaborado pelo autor.

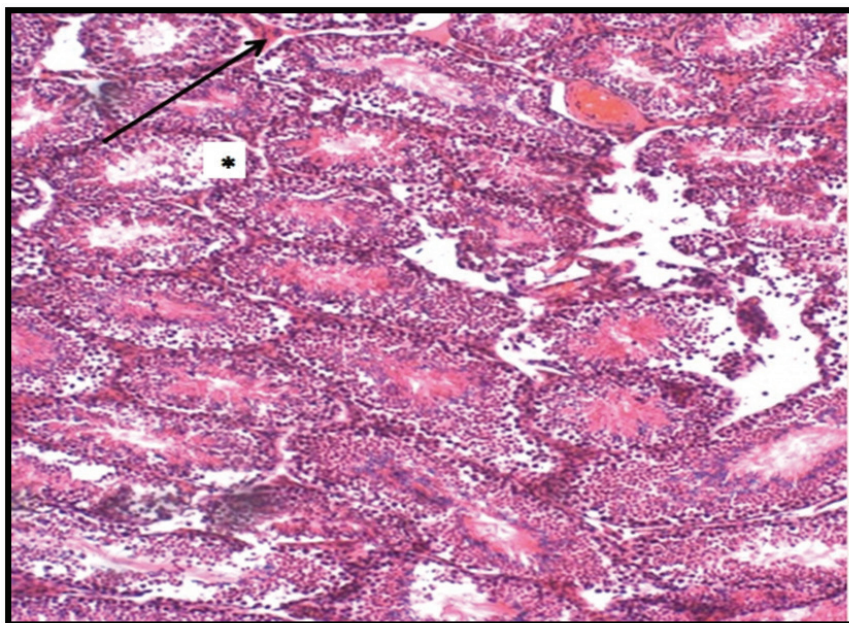


Figura 3 - Grupo TT - Representação da região de ducto epididimário. Epitélio pseudo-estratificado ciliado (*), intercalado por tecido muscular liso (seta). Hematoxilina-eosina, aumento de 20x.

Fonte: elaborado pelo autor.

Keshtmand (2015) postula que o TT reduz a necrose e apoptose celular, principalmente com o uso da cisplatina. Em seu estudo, notou-se aumento das gônadas dos animais, sugerindo maior espermatogênese. Concluiu também que o extrato da planta pode diminuir efeitos de quimioterápicos e reduzir radicais livres, protegendo células e órgãos não malignos dos danos da cisplatina. O presente estudo não corrobora com essa citação, visto que, apesar de ter ocasionado um aumento significativo de testosterona sérica nos animais suplementados (MOREIRA *et al.*, 2017), o TT promoveu ausência de espermatozoides nos túbulos seminíferos conforme descrito na análise histológica.

De acordo com Lize *et al.*, (1999), a administração de compostos exógenos que apresentam análogos a testosterona endógena afetam o eixo hipotálamo-hipofisário- gonadal, ou seja, diminuem a secreção dos hormônios hipofisários folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), ocasionando redução de testosterona sérica e subsequente redução da espermatogênese. No presente estudo, o aumento de testosterona sérica no grupo TT supostamente pode ter sido ocasionado por metabólitos da planta com composição química similar a testosterona endógena que podem ser detectados pelo exame bioquímico

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.*
Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus Terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus Terrestris L.* SALUSVITA, Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

adotado, no entanto, tais componentes poderiam ter exercido um mecanismo de feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise, implicando numa redução sérica de FSH e LH, o que supostamente poderia justificar a ausência de espermatozoide nos animais tratados com a planta. Novos estudos que repitam a administração adotada no presente estudo tornam-se necessários, tendo como objetivo mensurar os níveis séricos dos hormônios FSH e LH, a fim de elucidar a hipótese aqui apresentada e representada na figura 4, montada em conjunto com os resultados do teste comportamental e bioquímico realizado concomitantemente a este estudo (Moreira *et al.*, 2017).

Segundo Gilman *et al.*, (1996), o aumento de testosterona decorrente do uso de anabolizantes promove atrofia testicular, que pode ser irreversível e azoospermia (ausência de espermatozoides) por inibição da secreção de FSH e LH. A descrição histológica do presente estudo em relação à ausência de espermatozoides no grupo tratado com TT corrobora com essa citação, uma vez que, hipoteticamente, o *Tribulus terrestris L.* possui componentes que ao sofrerem metabolismo se convertem em testosterona – ao contrário da administração do hormônio exógeno (GAUTHAMAN, 2008).

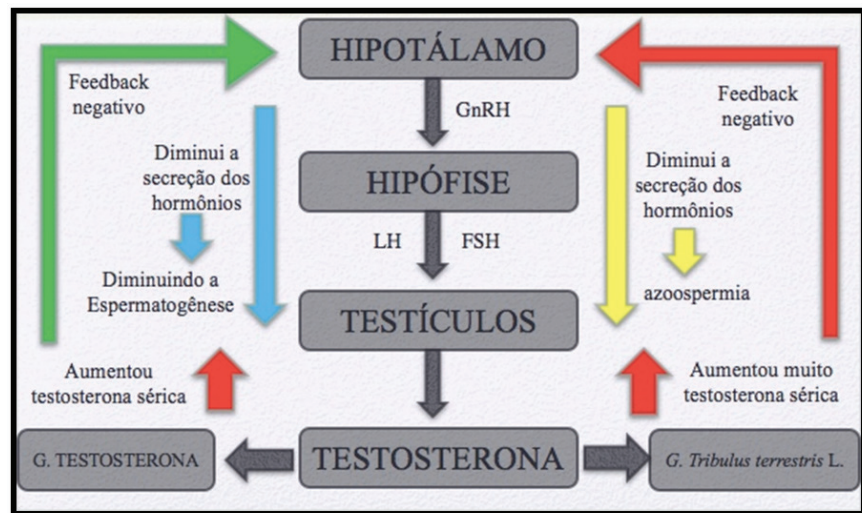


Figura 4 - O hipotálamo libera o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) como impulso inicial a produção de testosterona. O GnRH atua na hipófise, estimulando a mesma a liberar os hormônios Luteinizante (LH) e Foliculoestimulante (FSH), que atuam principalmente nos testículos, fazendo com que os mesmos secretem a testosterona. No grupo suplementado com a testosterona ouve um incremento de testosterona sérica, o que, possivelmente, causou um efeito de feedback negativo no hipotálamo, diminuindo sua secreção de GnRH e, conseqüentemente, fazendo com que a hipófise secretasse menor quantidade de LH e FSH, diminuindo a produção de testosterona. No grupo suplementado com a planta TT o incremento de testosterona sérica foi muito maior, dando a entender que o efeito de feedback negativo atuou com mais potência no eixo

hipotálamo-hipófise. Como a produção de espermatozoides depende em partes da testosterona endógena, justifica-se a azoospermia visualizada no grupo TT.

Fonte: elaborado pelo autor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se a ausência de espermatozoides no grupo TT, supostamente por um incremento de testosterona sérica que exerceu um efeito de feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise, conforme já apresentado por Moreira *et. al.*, (2017) (figura 5).

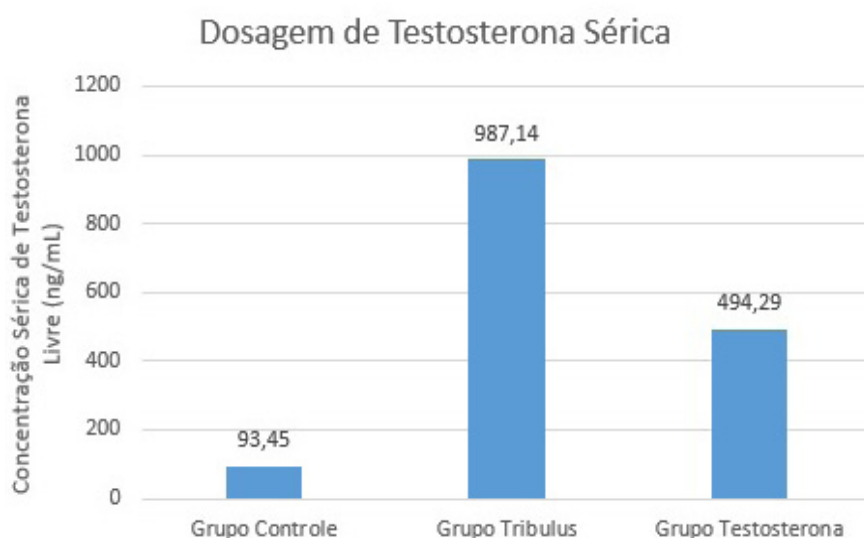


Figura 5 - Comparação das médias de testosterona sérica entre os grupos de experimento.

Fonte: Adaptado de Moreira *et. al.* (2017)

Evidencia-se a necessidade de novos estudos a fim de avaliar os componentes químicos da planta e suas capacidades de alterar funções fisiológicas, além da dosagem dos hormônios GnRH, LH e FSH para comprovar a hipótese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade do Sagrado Coração por ceder o espaço e oportunidade para a realização do presente estudo. Grato a Dra. Patricia Saraiva que gentilmente nos cedeu seu tempo e conhecimen-

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus Terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

MOREIRA, Lucas
Roberto *et al.*
Estudo histológico
dos testículos de
camundongos suíços
machos suplementados
com propionato de
testosterona e *Tribulus*
Terrestris L. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 37, n. 3,
p. 633-643, 2018.

tos na análise das lâminas. Agradeço também a minha orientadora, Márcia, e os coautores Thainá e Jonatas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE JUNIOR, E. S. de.; CLAPAUCH, R.; BUKSMAN, S. Short term testosterone replacement therapy improves libido and body composition. **Arq Bras Endocrinol Metab.** São Paulo, v. 53, n. 8, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000800014>
- FREYBERGER, A.; SHLADT, L. Evaluation of rodent Hershberger bioassay on intact juvenile males- Testing of coded chemicals and supplementary biochemical investigations. **Toxicology.** Amsterdam, v. 3, n. 262, p. 114-120, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467291>>
- 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, v. 15, n. 1-2, p. 44-54, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18068966>>
- GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** Singapore: McGraw-Hill Book Co., p. 1441-57. 9th ed, 1996.
- GINZBURG, E. et al. Long-term safety of testosterone and growth hormone supplementation: a retrospective study of metabolic, cardiovascular and oncologic outcomes. **J Clin Med Res.** Canada, v. 2, n. 4, p. 159-166, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104655>>
- 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. **Biol Reprod.** New York, v. 82, n. 6, p. 1139-1150, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164437>>
- KESHTMAND, Z.; GHANBARI, A.; KHAZAEI, M.; RABZIA, A. Protective Effect of Tribulus terrestris Hydroalcoholic Extract Against Cisplatin-Induced Apoptosis on Testis in Mice. **Int. J. Morphol.**, Chile, v. 33, n. 1, p. 279-284, 2015.
- LIZE, M. Z.; SILVA, G.; FERIGOLO, M.; BARROS, H. M. T. O Abuso do Esteróide Androgênico em Atletismo. **Rev. Ass. Méd. Brasil,** v. 45, n. 4, p. 364-70, 1999.
- MOREIRA, L. R.; BERTOZZO, T. V.; ANGELO, J. M. A.; MAR-

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.*
Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus Terrestris* L. **SALUSVITA,** Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Estudo histológico dos testículos de camundongos suíços machos suplementados com propionato de testosterona e *Tribulus Terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 37, n. 3, p. 633-643, 2018.

CELLINO, M. C. L. 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. Disponível em: <https://secure.usc.br/static/biblioteca/salusvita/salusvita_v36_n4_2017_art_07.pdf>

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

SATLER, F. R. et al. Testosterone and growth hormone improve body composition and muscle performance in older men. *J Clin Endocrinol Metab*. Washington, v. 94, n. 6, p. 1991-2001, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19293261>>