

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE *TRIBULUS TERRESTRIS* L. NA OCORRÊNCIA DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS FÊMEAS OVARIETOMIZADAS E NÃO OVARIETOMIZADAS

Evaluation of the extract effect of Tribulus terrestris L. on the occurrence of the estral cycle of ovariectomized and not ovariectomized female swiss mice

Thainá Valente Bertozzo¹

Lucas Roberto Moreira¹

Jonatas Medeiros de Almeida Angelo¹

Marcia Clélia Leite Marcellino¹

¹Universidade do Sagrado
Coração – Bauru/SP

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

RESUMO

Introdução: a infertilidade ou incapacidade de gerar filhos é um problema que acomete parte da população. Seu tratamento geralmente é feito pela reposição hormonal, no entanto, terapias alternativas com o uso de plantas medicinais vêm sendo adotadas. **Objetivo:** diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar

Recebido em: 23/01/2019
Aceito em: 29/03/2019

o efeito do extrato do *Tribulus terrestris* L. na ocorrência do ciclo estral em camundongos fêmea ovariectomizadas e não ovariectomizadas. **Métodos:** foram utilizados 28 camundongos suíços fêmeas e adultas, divididas em quatro grupos de 7 animais: grupo sem ovariectomia e sem suplementação ou controle, grupo com ovariectomia e sem suplementação, simulando a infertilidade, grupo tratado com *Tribulus terrestris* (10mg/kg) com ovariectomia e grupo tratado com *Tribulus terrestris* L. (10mg/kg) sem ovariectomia. Os extratos foram administrados por gavagem durante 21 dias. O ciclo estral foi analisado ao longo deste mesmo período. **Resultados:** notou-se aumento significativo na fase proestro do ciclo estral no grupo ovariectomizado e suplementado quando comparado ao grupo ovariectomizado e sem suplementação. **Conclusão:** o aumento significativo na ocorrência do proestro corresponde a um período do ciclo estral relacionado à ocorrência da ovulação.

Palavras-chave: Ciclo estral. Infertilidade. *Tribulus terrestris* L.

ABSTRACT

Introduction: *infertility or inability to generate children is a problem that affects part of the population. Its treatment is usually done by hormone replacement, however, alternative therapies with the use of medicinal plants have been adopted.* **Objective:** *in view of the above, the present study aimed to evaluate the effect of Tribulus terrestris L. extract on the occurrence of the estrous cycle in ovariectomized and non ovariectomized mice.* **Methods:** *twenty-eight female and adult Swiss mice were divided into four groups of 7 animals: group without ovariectomy and without supplementation or control, group with ovariectomy and no supplementation simulating infertility, group treated with Tribulus terrestris L. (10mg / kg) with ovariectomy and group treated with Tribulus terrestris L. (10mg / kg) without ovariectomy. The extracts were administered by way of gavage for 21 days. The estrous cycle was analyzed over this same time.* **Results:** *there was a significant increase in the proestrus phase of the estrous cycle in the ovariectomized group and supplemented when compared to the ovariectomized group and without supplementation.* **Conclusion:** *the significant increase in the occurrence of proestrus corresponds to a period of the estrous cycle related to the occurrence of ovulation.*

Keywords: *Estrous cycle. Infertility. Tribulus terrestris L.*

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris L.* Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

INTRODUÇÃO

A infertilidade consiste na incapacidade de gerar um filho após um ano de vida sexual ativa e sem o uso de métodos contraceptivos. A ocorrência de três ou mais abortos também caracteriza a infertilidade. O envelhecimento promove dificuldade em engravidar e, neste caso, a infertilidade é considerada por apenas seis meses de tentativas sem sucesso. No caso de a mulher nunca ter engravidado, a infertilidade é considerada primária, entretanto, quando a dificuldade em engravidar ocorrer após concepções anteriores, a infertilidade será classificada como secundária. (MARTINS *et al.*, 2009; ABDELMASSIH, 2007).

Segundo Aldrighi (2006), a infertilidade feminina é considerada multifatorial, sendo a oligomenorreia (ciclos menstruais irregulares) ou amnorreia (ausência de fluxo menstrual) acompanhadas de anovulação responsáveis por cerca de 20 a 30% dos casos. (IZZO *et al.*, 2008). Alterações estruturais, distúrbios imunológicos, endometriose, síndrome de ovários policísticos (SOP) e fatores como obesidade, idade avançada, frequência de relação sexual e tabagismo também são problemas que colaboram para o quadro de infertilidade (MARTINS, 2009).

O consumo de álcool e cigarro, o sedentarismo, doenças sexualmente transmissíveis (DST's), obesidade e a poluição interferem negativamente na fertilidade, tanto masculina quanto feminina. Por esse motivo, a prevalência dos casos de infertilidade aumentará nos próximos anos, visto que são hábitos frequentes em nosso dia a dia. Ademais, mulheres que desejam ter filhos estão cada vez mais adiando sua maternidade devido ao mercado profissional, o que contribui para outro fator importante na infertilidade: a idade avançada (REMOALDO *et al.*, 2011).

A endometriose, doença que pode ter relação com a infertilidade, acomete cerca de 10 a 20% das mulheres em idade reprodutiva (ESHRE, 2007). Estudos relatam que cerca de 30 a 50% das mulheres acometidas pela doença não são férteis, contribuindo com a hipótese que sugere que a endometriose tem importância na etiopatogênese da infertilidade (DONNEZ *et al.*, 2003)

Segundo Eshre (2007), a endometriose é caracterizada pela presença de tecido endometrial funcionando fora da cavidade uterina. Isso pode comprometer vários órgãos e regiões, como: ovários, peritônio, região retrocervical, bexiga, sigmoide, outras porções do trato digestivo e até mesmo o reto. Ainda não se sabe por quais mecanismos a endometriose causa a infertilidade, porém, oclusão tubária, aderência e distorções causadas pela patologia estão obviamente as-

sociadas à infertilidade, quando observados os casos avançados da doença (OLIVE *et al.*, 1993). Além disso, as alterações inflamatórias, endócrinas e imunológicas no peritônio da pelve faz com que prostaglandinas sejam liberadas, facilitando ainda mais essas distorções anatômicas, e causando não só infertilidade, como também dor (GIUDICE *et al.*, 2004).

Segundo Viganò *et al.* (2004), dosagem de linfócitos, células natural killers (NK), macrófagos ativados e interleucinas tipo 2 no fluido peritoneal estão também associados ao quadro de infertilidade relacionada à endometriose. Outra patologia relacionada à infertilidade é a síndrome dos ovários policísticos (SOP), também conhecida como anovulação crônica hiperandrogênica. É caracterizada por irregularidades ovarianas, que afetam cerca de 5 a 10% das mulheres na idade reprodutiva, relacionadas com a genética, somadas às influências do ambiente externo. (COSTA *et al.*, 2007).

Em portadoras da síndrome, as gonadotrofinas (hormônios atuantes nas gônadas) apresentam um padrão anormal de liberação. Exemplo disso é o hormônio luteinizante (LH), que se mostra muito superior aos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH). Quando isso acontece, a progesterona diminui o estímulo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), fazendo com que os níveis de LH liberados pela hipófise aumentem ainda mais (COSTA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2006). Como consequência, haverá diminuição do FSH e dos níveis de ovulação, já que as células da granulosa não conseguem aromatizar androgênios em estrogênios. Isso faz da SOP a causa mais comum de infertilidade por anovulação (MOURA *et al.*, 2011).

Esta síndrome causa ainda alterações na insulina, pois há alteração nas células beta do pâncreas que deixam de responder corretamente, acarretando intolerância à glicose, podendo causar também diabetes tipo 2 (FARIA *et al.*, 2013). Todos esses fatores, associados ainda à obesidade, causam elevadas taxas de aborto, menor taxa de gravidez, uso de maiores doses de gonadotrofinas e também altas taxas de cancelamento da ovulação (MATHUR *et al.*, 2008).

Além de a SOP e a endometriose estarem relacionadas à infertilidade, podemos citar os miomas como agentes importantes na diminuição da fertilidade. Estes são tumores benignos que podem atingir tamanhos variados dependendo da quantidade de estrogênio liberada, que faz com que as células da musculatura lisa do miométrio cresçam exacerbadamente (GRIFFITHS *et al.*, 2003). Causam sintomas como menorragia, massa pélvica, alterações urinárias e intestinais, bem como dores e infertilidade (ALBUCHON *et al.*, 2002). Os tumores submucosos são causadores de sangramentos, os mais as-

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris L.* Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

sociados aos distúrbios reprodutivos. (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2001).

Segundo autores como Griffiths *et al.* (2003), Donnez *et al.* (2002) e Bernard *et al.* (2000), são vários mecanismos pelos quais esses tumores causam a infertilidade: alteração do contorno endometrial, aumento e deformação da cavidade uterina, coágulos intrauterinos e obstrução do óstio tubário. Porém, nenhum deles confirmado como fator etiológico da infertilidade.

A partir da hipótese patológica de cada paciente, diferentes exames são pedidos para que as causas sejam esclarecidas e confirmadas, o que pode se dar através de diagnóstico por imagem, exames bioquímicos, exames imunológicos ou laparotomia, técnicas que auxiliam na solução da infertilidade na mulher (PASSOS *et al.*, 2007).

Para suspeitas de distúrbios hormonais como causadores da infertilidade, se recomenda dosagens de hormônios como FSH, responsável pelo amadurecimento do folículo e LH, responsável pela sua ruptura. Além destes, recomenda-se ainda dosagens de estradiol, prolactina, hormônio tireo-estimulante (TSH) e testosterona para apurar a origem da anovulação (ALDRIGH, 2006).

A SOP é um exemplo de doença que pode ser diagnosticada através de dosagens hormonais, já que é uma síndrome que está ligada aos níveis anormais de FSH e LH, e à produção de andrógenos. Seu diagnóstico é feito através de dosagens de níveis séricos de testosterona, estradiol, gonadotrofinas, TSH, T4 livre, hormônio desidroepiandrosterona (DHEA), entre outros, juntamente com os exames de imagem para o seu diagnóstico (MORAES *et al.*, 2002).

A ultrassonografia é a técnica de diagnóstico por imagem mais utilizada. Pode apresentar-se como bidimensional e tridimensional, visualizando estruturas com alta sensibilidade e especificidade, além de baixo custo (MARTINS *et al.*, 2009). Através dela, faz-se um estudo dinâmico da pelve, sendo possível fazer varredura do útero, por exemplo, que pode ser também o responsável pela infertilidade, já que em sua estrutura ocorre o desenvolvimento do embrião. Sua investigação anatômica permite detectar malformações classificadas como útero arqueado, septado, bicorno, e bidelfo, por exemplo (ALDRIGHI, 2006). Além disso, é possível ainda diagnosticar, através dos exames de imagem, as já citadas SOP, a endometriose, os miomas e também pólipos endometriais e endocervicais (PASSOS, 2007).

As vias para se obter imagens de ultrassonografia são a abdominal, vaginal, perineal, introital e retal, sendo mais amplamente usada a transvaginal (MARTINS *et al.*, 2009). A partir delas, a pelve feminina pode ser retratada em escalas de cinza. As estruturas pesquisadas apresentam padrões, e quando estes se mostram alterados na

ultrassonografia, servem para o diagnóstico de patologias (FLEISCHER *et al.*, 2000).

O recurso mais invasivo é conhecido como laparoscopia, sendo usado tanto para diagnóstico, como para tratamento. Para executar a técnica, faz-se uma incisão no umbigo, e nesta passará o laparoscópio (instrumento de fibras ópticas), que irá transmitir imagens da região abdominal, com o auxílio de gás carbônico para assegurar que os órgãos se mantenham espaçados. Através da laparoscopia, é possível diagnosticar problemas envolvendo o útero, tubas e ovários e, se necessário, executar a cirurgia. (BORGES *et al.*, 2005; MAIOR, 2005). Por também remover implantes endometriais e aderências, a laparoscopia é considerada padrão ouro para tratamento da endometriose, pois reestabelece a anatomia normal da pelve. Pode também ser feita em mulheres com SOP, porém riscos como destruição do parênquima ovariano e adesão fazem com que o procedimento não seja efetivo na grande maioria dos casos. (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 1996; BALEM, 2006; ESHRE, 2007; ESHRE, 2008).

Se a paciente sofrer abortos de repetição, e ao tentar o procedimento de fertilização *in vitro* falhar por várias vezes, a avaliação imunológica é o exame diagnóstico a ser feito (GONÇALVES, 2008). Nesse diagnóstico, são pesquisados fatores que culminam em um desequilíbrio do sistema imune e que complicam a gravidez, podendo resultar em perdas fetais, tais como: fator antinúcleo (FAN), células Natural Killer, anticorpos antitireóide e antilipídeos. (GONÇALVES, 2008; SILVA *et al.*, 2005).

É possível, ainda, encontrar anticorpos anti-espermatozóides no soro ou muco cervical da paciente, o que impossibilita a fecundação. Neste caso, são realizados testes como immunobead, que detecta imunoglobulinas A, G e M, e também o mer-test, que detecta ou não aglutinação do soro na presença de espermatozóides. (BARINI, 1998; MACHADO *et al.*, 2011; FILHO *et al.*, 1998)

Os tratamentos convencionais para tentar reverter o processo da infertilidade consistem em indutores de ovulação, uso de gonadotrofinas e cirurgia. O tratamento cirúrgico mais recomendado é a já citada laparoscopia. Em relação aos casos de SOP, por exemplo, o uso de um indutor de ovulação chamado metformina tem se mostrado uma opção, visto que melhora a sensibilidade à insulina e facilita o transporte de glicose. Isso faz aumentar a atividade da tirosina quinase nos receptores de insulina, sendo mais efetiva para ocorrência de ovulação (DOMINGUEZ *et al.*, 1996). Além dela, o uso de citrato de clomifeno, droga pioneira no estudo de indução da ovulação em mulheres com oligomenorreia, também é uma opção (LORD *et al.*, 2003).

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris L.* Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

Nos casos em que drogas indutoras não são efetivas na promoção da ovulação, podem ser usadas gonadotrofinas. Não pode exceder seis ciclos ovulatórios e a dose inicial recomendada é de 37,5 a 50,0 unidades internacionais (UI) por dia para estimulação ovariana (ESHE, 2008). Outra proposta de tratamento para melhorar a resposta ovariana é a associação com androgênios, essenciais para a maturação folicular e fertilidade. Estes agem de forma sinérgica ao FSH em relação ao recrutamento folicular e à proliferação de células da granulosa. Sua deficiência está relacionada à baixa reserva ovariana, independentemente da faixa etária. (WEIL *et al.*, 1999; GLEICHER *et al.*, 2011).

A testosterona e a desidroepiandrosterona (DHEA) são os principais androgênios utilizados na estimulação dos ovários. Atuam na foliculogênese, promovendo o crescimento de folículos antrais e impedindo a oclusão folicular. (SUNKARA *et al.*, 2011; VENDOLA *et al.*, 1999). Para mulheres às quais todas as opções demonstradas não surtiram efeito, ainda há um tratamento alternativo: a fitoterapia. O uso de plantas medicinais como tratamento alternativo vem sendo recorrente há milhares de anos, e a ciência relata a eficácia desses produtos. Plantas vêm sendo usadas para distúrbios de fertilidade há muito tempo, e recomenda-se que casais com dificuldade para gerar um filho façam um tratamento natural antes de tratamentos invasivos, buscando uma dieta saudável para eliminar possíveis toxinas do organismo. Exemplo de fitoterápico que pode agir na fertilidade é a erva False Unicorn. Sua raiz é utilizada para tonificar o útero e tem reputação em promover a fertilidade. Ainda por cima, existem indícios de aumento na taxa de gestação com a sua utilização, podendo ter efeito diurético e diminuir cólicas menstruais. Outro exemplo é a *Dioscera villosa*, conhecida como Yam, que supostamente aumenta a fertilidade e também as taxas de gravidez, tendo componentes químicos que estimulam o crescimento dos óvulos; e além disso contém fitoestrogênios. (CAMBIAGHI *et al.*, 2004).

O *Tribulus terrestris*, popularmente conhecido como ‘Viagra natural’, é uma planta da família Zygophyllaceae, da Índia, mas amplamente distribuída em regiões quentes ao redor do mundo (KOSTOVA *et al.*, 2005). Na medicina tradicional oriental, o fruto e suas sementes são utilizados no tratamento de infertilidade, impotência, disfunção erétil e da libido (GAUTHMAN *et al.*, 2008). Estudos avaliaram o efeito do *Tribulus terrestris* no sistema reprodutor masculino e mostraram que a planta poderia influenciar positivamente a espermatogênese. Seu ativo químico é a protodioscina (PTN), semelhante ao DHEA. (BASHIR *et al.*, 2009; ELAHI *et al.*, 2013; GAUTHMAN *et al.*, 2003).

Os constituintes principais da planta são os esteróides, as saponinas, os flavonóides e os alcalóides. As saponinas se destacam, pois quando encontradas em sua forma hidronizada, têm a capacidade de se transformar em sapogeninas esteroidais. Nesta configuração, possuem propriedades diuréticas, antiespasmódica e também aumentam a produção de esteróides como o LH, testosterona e estrogênio. (LIMA *et al.*, 2008)

Através de estudos, foi descoberto que o *Tribulus terrestris* aumenta os níveis dos hormônios testosterona, LH, FSH e estradiol, e que os níveis de testosterona são aumentados na presença de androstenediona e DHEA, havendo melhorias nas funções reprodutivas, incluindo aumento na produção de esperma e níveis de testosterona em homens e aumento da concentração de hormônios femininos em mulheres. Além disso, o *Tribulus terrestris* tem efeito estimulante no fígado, diminuindo colesterol e ácidos graxos que inibem seu funcionamento. A dose recomendada via oral varia de 5 miligramas/kilograma (mg/kg) a 10mg/kg, podendo chegar de 250 mg a 1000 mg diárias, dependendo do peso do paciente e também de sua dieta. (VANACLOCHA *et al.*, 2003).

Estudos realizados em babuínos, macacos Rhesus, coelhos e ratos castrados mostraram que o tratamento agudo, por via intravenosa com um extrato de *Tribulus terrestris* a 7,5 mg / kg, resultou num aumento significativo dos androgênios no sangue (sendo testosterona, DHT e DHEAS: 52, 31 e 29%, respectivamente) nos primatas, DHT aumentado em 30% nos coelhos, e testosterona total no sangue elevada 25% em ratos castrados (GAUTHAMAN *et al.*, 2008). Em contraste com estes resultados, um estudo realizado por Martino - Andrade *et al.* (2010) não mostrou alterações de testosterona no sangue de ratos castrados, após 28 dias de tratamento oral com uma dose elevada diária de *Tribulus terrestris*. Outro estudo, desenvolvido por Neychev (2005), revelou que não houve alterações significativas nas concentrações dos hormônios testosterona, LH e androstenediona em homens adultos com uma suplementação desta planta durante quatro semanas.

Estudos sobre toxicidade da planta foram realizados apenas entre os animais. O único caso de intoxicação em humanos relatado foi em um jovem, que consumiu durante dois dias uma alta dose da planta para evitar a formação de pedra nos rins. Após uma semana hospitalizado, os sintomas de hepatite e necrose renal diminuíram (TALAZAS *et al.*, 2010).

O *Tribulus terrestris* L. é uma espécie vegetal que tem sido utilizada para fim anabólico da musculatura esquelética por homens e mulheres adeptos à prática da atividade física. Seu suposto meca-

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

nismo de ação está envolvido com o aumento dos níveis séricos do hormônio testosterona. Diante do exposto, a investigação sobre os efeitos desta planta na fertilidade feminina torna-se relevante para garantir a segurança no seu consumo.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de ciclo estral em suas diversas fases em camundongos suíços fêmeas com e sem ovariectomia bilateral.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Animais e grupos

Foram utilizados 28 camundongos suíços, fêmeas e adultas, cedidos pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Durante o período experimental, os animais permaneceram acondicionados em gaiolas de polietileno, contendo 7 animais em cada gaiola. A oferta da ração comercial para roedores e o fornecimento de água foi *ad libitum*. O ambiente de manutenção foi mantido com ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura entre 22 e 25°C, constantemente limpo e arejado. Durante todo o experimento, o controle, a manutenção e a observação dos animais foram executados no Biotério da USC.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da USC, protocolo nº 2224230216.

Os animais foram divididos em 4 grupos de experimento:

- Grupo Controle sem ovariectomia e sem suplementação (n=7): receberam 0,2mL de veículo aquoso sem extrato, por gavagem.
- Grupo controle com ovariectomia e sem suplementação (n=7): receberam 0,2mL de veículo aquoso sem extrato, por gavagem.
- Grupo tratado com *Tribulus terrestris* L. com ovariectomia (n=7): receberam 10mg/kg concentrado em 0,2 mL de veículo aquoso, por gavagem.
- Grupo tratado com *Tribulus terrestris* L. sem ovariectomia (n=7): receberam 10mg/kg concentrado em 0,2 mL de veículo aquoso, por gavagem.

A administração foi feita por gavagem, por um período de 21 dias. Os extratos foram manipulados na Farmácia Formulare, localizada na cidade de Bauru, que emitiu o laudo de controle de qualidade do extrato dos frutos do *Tribulus terrestris* L.

2 - Ovariectomia bilateral

Os animais do grupo controle com ovariectomia e sem suplementação (n=7 animais) e do grupo tratado com *Tribulus terrestris* L. com ovariectomia (n=7 animais) foram submetidos a ovariectomia bilateral, simulando desta forma a redução hormonal típica da menopausa e infertilidade. Inicialmente, foi administrado o relaxante muscular Cloridrato de Xilazina (Anasedan®) na dose de 0,2 mL e do anestésico geral Cloridrato de Ketamina (Dopalen®), na dose de 0,2 mL, ambos por via intraperitoneal. A castração foi realizada com todos os cuidados de assepsia e com material cirúrgico estéril. A sequência do procedimento cirúrgico ocorreu da seguinte maneira:

- a) Assepsia com povidine tópico® da região ventral dos animais;
- b) Retirada dos pelos da região ventral por tricotomia com lâmina de bisturi;
- c) Incisão dorsal paravertebral à direita com aproximadamente 2 cm de extensão;
- d) Afastamento da musculatura com farabeufs;
- e) Abertura do peritônio abaixo da última costela;
- f) Pinçamento da gordura peritoneal;
- g) Identificação do útero e dos ovários;
- h) Exérese dos ovários;
- i) Hemostasia;
- j) Fechamento da musculatura da parede abdominal e pele com pontos simples de fio de algodão agulhado 3.0.

Após a cirurgia, os animais receberam enrofloxacino (Flotril® 2,5%, Schering-Plough), numa dose de 10mg/kg de peso corpóreo, por via intramuscular. Para analgesia, foi administrada por via subcutânea dipirona sódica, na dosagem de 0,5 g/mL.

Após 40 dias, foi realizado o esfregaço vaginal para confirmação da irregularidade nas fases do ciclo estral.

3. Determinação das fases do ciclo estral

As fases do ciclo estral foram analisadas nos animais submetidos a ovariectomia bilateral após 40 dias do procedimento cirúrgico, e para isso, foram feitas semanas-teste de análise do ciclo, até confirmar predominância de diestro e metaestro (representando a queda hormonal), evidenciando a irregularidade do ciclo; depois foi

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

dado início ao tratamento em todos os grupos de experimento. O esfregaço vaginal foi realizado segundo o fundamento proposto por Marcondes *et al.* (2002). Com micropipeta automática, foi obtida uma alíquota de 50 microlitros (μL) de soro fisiológico 0,9%, que foi introduzido no canal vaginal do camundongo para obtenção do lavado celular. O lavado foi distendido em uma lâmina para microscopia de luz, corado com azul de metileno a 1% e observado com aumento de 40 vezes. Os lavados vaginais foram coletados diariamente, às 13 horas, durante os 21 dias de tratamento, sendo observadas as fases Metaestro e Diestro, Proestro e Estro. Os dados foram diariamente anotados em formulários para posterior análise estatística.

4 - Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do Software Graphpad Prism 5, sendo empregado o teste paramétrico *T-Student*, com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra o gráfico com as médias de ocorrência das quatro fases do ciclo estral num período de 21 dias. Foi evidenciado aumento significativo na ocorrência do proestro no grupo castrado e suplementado com *Tribulus terrestris* L. em comparação ao grupo castrado e não suplementado. Quanto à comparação entre os demais grupos, não foram evidenciadas alterações na ocorrência das demais fases do ciclo.

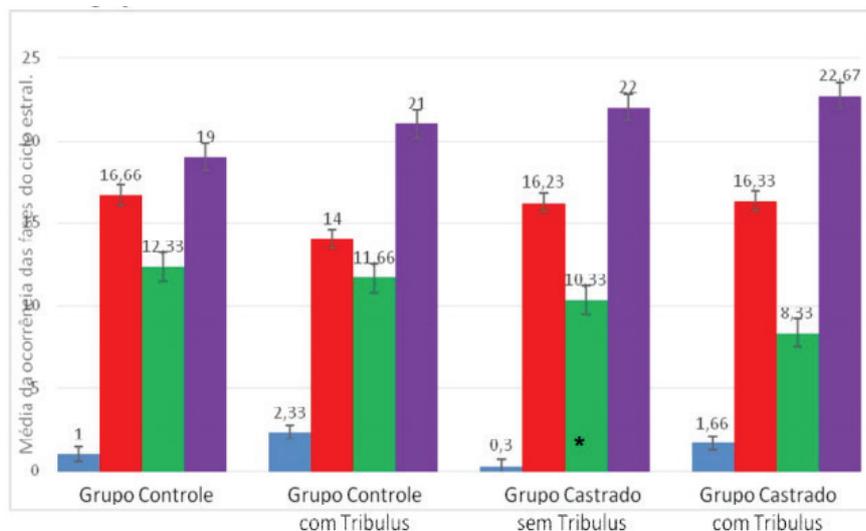


Figura 1 - Comparação das médias de ocorrências das fases do ciclo estral nos grupos de experimento. Software Graphpad Prism 5; Teste T-Student ($p < 0,05$).
* Valor significativo entre os grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

No presente estudo, 40 dias após a realização da ovariectomia bilateral foram realizados testes de análise da ocorrência do ciclo estral dos animais submetidos ao procedimento de castração. Foi evidenciada a predominância significativa ($p < 0,05$ - Teste T- *Student*) da fase metaestro. De acordo com Constanzo (1999), o ciclo estral de roedores como os camundongos dura em média de quatro a cinco dias, e sua ocorrência é marcada por 4 fases (proestro, estro, diestro e metaestro), na qual nota-se alterações citológicas ocorridas na mucosa vaginal, as quais podem ser identificadas pelas características obtidas pelo esfregaço vaginal. Para Aires (1999), se não há concepção, após o estro há um período de recuperação denominado metaestro, cuja duração é de 24 a 48 horas, corresponde à fase entre os ciclos, na qual não há ação hormonal identificável e as células vaginais se mostram diversificadas. Diante do exposto, os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram nos animais castrados a irregularidade dos ciclos.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris L.* Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

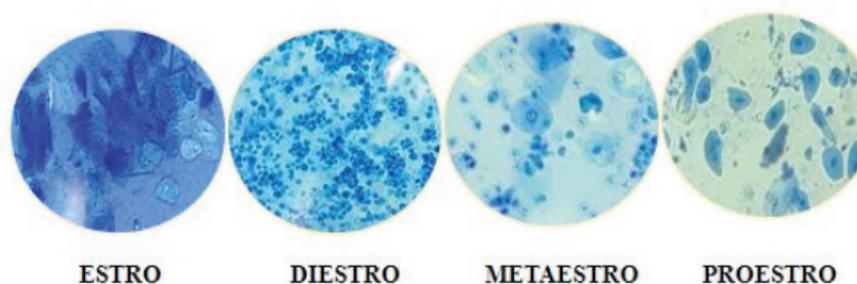


Figura 2 - Fases do ciclo estral.

Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo Freeman (1994), o proestro é a fase do ciclo estral na qual ocorrem inúmeras e intensas alterações hormonais. Nesta fase, ocorrerá o pico plasmático do hormônio luteinizante (LH), prolactina e hormônio folículo estimulante (FSH). O mesmo autor ressalta que a ovulação também faz parte do proestro. Diante do exposto, o presente estudo evidenciou aumento significativo na ocorrência do proestro nos animais castrados e suplementados com extrato de *Tribulus terrestris* L. em comparação ao grupo castrado sem suplementação, sugerindo que esta planta apresenta possível potencial para aumentar a ocorrência de ovulações ou fertilidade dos animais.

De acordo com Shahid *et al.* (2016), o *Tribulus terrestris* L. tem atividades farmacológicas diversificadas, incluindo efeito afrodisíaco, anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, sendo mais frequentemente usado para tratar perda da libido e infertilidade. Os resultados evidenciados no presente estudo corroboram com esta citação, visto que, por um período de 21 dias de tratamento, os animais castrados e suplementados apresentaram aumento na ocorrência do proestro, evidenciando que a fase está associada à ovulação.

Um estudo conduzido por Abadjieva e Kistanova (2016) evidenciou pela primeira vez o efeito estimulante do *Tribulus terrestris* L. sobre a expressão do gene de diferenciação de crescimento Fator 9 (GDF9) e morfogeneticoproteína 15 (BMP15) em níveis de RNA mensageiro e proteína nos oócitos de células *cumulus* de coelhos em duas gerações. Estes genes são específicos dos ovócitos, e desempenham papel de fundamental importância na regulação da gênese dos folículos ovarianos de diferentes espécies. Esse estudo sugere que componentes bioativos desta planta apresentam capacidade de interagir com componentes genéticos dos folículos ovarianos, potencializando a fertilidade. Os resultados do presente estudo corroboram com esta citação, visto que o extrato do *Tribulus terrestris* L. aumentou a ocorrência do proestro.

Gama *et al.* (2014) e Adaay e Mosa (2012) mencionam que o extrato seco do *Tribulus terrestris* L. apresenta inúmeras substâncias com potencial biológico e que podem melhorar a disfunção sexual feminina, influenciando de forma positiva sua capacidade reprodutiva. A administração oral dos extratos aquosos do *Tribulus terrestris* L. aumenta o número de folículos crescentes em ratos, mas não altera significativamente os níveis de hormônio sexual. Novamente as citações associam o uso do *Tribulus terrestris* L. à melhora da fertilidade, corroborando com os resultados aqui expostos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato do *Tribulus terrestris* L., utilizado na concentração de 10 mg/kg durante 21 dias nos animais castrados, promoveu aumento significativo na ocorrência do proestro, quando comparado ao grupo castrado sem suplementação, sendo este um período do ciclo estral relacionado à ocorrência da ovulação.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

REFERÊNCIAS

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**, Amsterdam, v.11, n.2, fev. 2016.

ABDELMASSIH, R. Avanços em Reprodução Humana Assistida. São Paulo: **Atheneu**, 2007.

ADAAY, M.H., MOSA, A.R. Evaluation of the effect of aqueous extract of Tribulus terrestris on some reproductive parameters in female mice. **J. Mater. Environ. Sci.** [s.i], v.3, n.6, p. 1153–1162, jul. 2012.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.908. 1999.

ALDRIGHI, J. M. **Endocrinologia Ginecológica: Aspectos Contemporâneos**. São Paulo: Atheneu, 2006

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. **Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis**, 1996.

AUBUCHON, M, et al. Treatment of uterine fibroids. **Prim Care Update Obstet Gynecol**, [s.i], v. 9, n. 2, p. 231-237, 2002.

BALEN, A. Surgical treatment of polycystic ovary syndrome. **Pract Res Clin Endocrinol Metab**. Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 271-280, 2006

BARINI, R. et al. Abortamento recorrente de causa imunológica: avaliação de um protocolo de investigação e tratamento. **Rev Bras Ginecol Obstet**. São Paulo, v. 20, n. 2, 1998.

BASHIR A, et. al. Efeitos da Tribulus terrestris em desenvolvimento testicular de ratos albinos imaturos. **Biomedica**. Bogotá, v. 25 n. p. 63-68, 2009.

BERNARD, G., et al. Fertility after hysteroscopic myomectomy: effect of intramural myomas associated. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. Limerick, v. 88, n. 1, p. 85-90, 2000.

BORGES, L. S.et al., Avaliação da concordância diagnóstica entre métodos não invasivos e endoscopia na investigação de infertilidade. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. Ribeirão Preto, v. 27, n. 7, p. 401-406, 2005

CAMBIAGHI, A. S. CASTELLOTI D. S. **Fertilidade natural: os tratamentos naturais que podem melhorar a fertilidade do casal:**

de volta ao passado a caminho do futuro. São Paulo: Editora La-Vidapress, 2004.

CONSTANZO L.S. **Fisiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1999.

COSTA L., et al., Prevalência da síndrome metabólica em portadores da síndrome dos ovários policísticos. **Rev Bras Ginecol Obstet.** São Paulo, v.29, n.1, p.10-17, 2007.

DOMINGUEZ L.J, et al. Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. **Endocrinology.** Detroit, v. 137, n.1, p.113-21, 1996.

DONNEZ J, et al. Laparoscopic management of peritoneal endometriosis, endometriotic cysts, and rectovaginal adenomyosis. **Ann N Y Acad Sci.** New York, v. 997, p. 274-281, 2003.

DONNEZ J, JADOUL, P. What are the implications of myomas on fertility? **Hum Reprod.** Oxford, v. 17, n. 6, p. 424-30, 2002.

ESHRE, A.S.R. **Guideline for the Diagnosis and Treatment of Endometriosis,** 2007 Disponível em: <<http://guidelines.endometriosis.org/>>.

ESHRE, A. S. R. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod.** Oxford, v. 23, n. 3, p. 462-77, 2008.

FARIA FR, et al. Síndrome do ovário policístico e fatores relacionados em adolescentes de 15 a 18 anos. **Rev Assoc Med Bras.** São Paulo, v. 59, n. 4, 2013

FILHO, J. H.; CADENHO, A. P. Infertilidade para o Urologista Geral – Parte 4: Exames Complementares. São Paulo: UNIFESP, 1998.

FLEISCHER, A. C. et al. Ultra-sonografia em Obstetrícia e Ginecologia: Princípios e Prática. 5. Ed. Rio de Janeiro: **Revinter,** 2000.

FREEMAN M. E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. **In the physiology of reproduction.** Second edicion. New York. E Kobil and J. D. Neill, Raven Press, 1994; p. 613-58.

GAMA, C.R., et al. Clinical Assessment of Tribulus terrestris Extract in the Treatment of Female Sexual Dysfunction. **Clin Med Insights Womens Health.** Auckland, v. 22, n. 7, p.45-50, 2014.

GAUTHAMAN K, Ganesan AP. The hormonal effects of Tribulus terrestris and its role in the managements of male erectile dysfunction-an evaluation using primates, rabbits and rat. **Phytomedicine.** Stuttgart, v.15 p. 44–54, 2008.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris L.* Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA,* Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

GAUTHAMAN, A. P. Ganesan, and R. N. Prasad “Sexual effects of puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (protodioscin): an evaluation using a rat model” **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New York, v. 9, n. 2, p. 257–265, 2003.

GIUDICE LC, KAOL, L.C. Endometriosis. **Lancet**. London, v. 13-19, n. 364 (9447), p. 1789-99, 2004

GLEICHER, N., BARAD, D.H. Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in diminished ovarian reserve (DOR). **Reprod Biol Endocrinol**. London, v.9, n.67, 2011

GONÇALVES, S. P. **Imunologia reprodutiva na prática clínica: uma visão crítica. Femina**. São Paulo, v. 36, n.3, p. 151-157, março 2008.

GRIFFITHS A, et al. Surgical treatment of fibroids for subfertility: protocol for a Cochrane review. **The Cochrane Library**, 2003.

IZZO, C. R. Infertilidade de causa hormonal para o ginecologista. **Educação continuada em reprodução humana**. São Paulo, ano 6, n. 2, 2008.

KOSTOVA I, D. DINCHEV. Saponinas em *Tribulus Terrestris* : química e bioatividade. **Phytochem Rev**. Dordrecht, v.4, p.111-137, 2005.

LIMA, S.M.R.R., et al. Considerações sobre a sexualidade humana e *Tribulus terrestris*. **Ars Cvrandi**. São Paulo, v.1, p.7-11, 2008.

LORD J.M., et. al. Metformin in polycystic 37. ovary syndrome: systematic review and metaanalysis. **BMJ.**, London, n. 327, p. 951, 2003

MAIOR, M. C. F. S. Perfil Cirúrgico das Videolaparoscopias Ginecológicas em um Hospital Escola: **Série de Casos**. Recife: IMIP, 2005

MARCONDES F. K., BIANCHI F. J., TANNO A. P.. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.** São Carlos, v.62, n. 4, Nov. 2002

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

MARTINS, M. A.; et al. *Clínica Médica*, v. 1, p. 501-506. São Paulo: **Manole**, 2009.

MATHUR R, Alexander CJ, Yano J, Trivax B, Azziz R. Use of metformin in polycystic ovary syndrome. **Am J Obstet Gynecol**. St. Louis, v. 199, n. 6, p. 596-609, 2008.

MORAES, L. A. M.; et al. **Síndrome dos Ovários Policísticos**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, Diretrizes da AMB, 2002.

MOURA, H.H.G., et al. Síndrome do ovário policístico: abordagem dermatológica. **An Bras Dermatol**. Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, Jan./Feb. 2011.

NEYCHEV, V.K., MITEV, V.I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **J Ethnopharmacol**. Lausanne, v. 101, p. 319-23, 2005.

OLIVE, D. L, Schwartz LB. Endometriosis. **N Engl J Med.**, Boston, v. 17, n. 328(24), p. 1759-69, 1993.

PASSOS, E. P. et al. Quando a Gravidez Não Acontece. Porto Alegre: **Artmed**, 2007.

REMOALDO, P.C.A., Machado H.C.F. A infertilidade no Conselho de Guimarães: contributos para o bem-estar familiar. **Universidade do Minho**. 2011.

SHAHID, M., et al. Phytopharmacology of *Tribulus terrestris*. **J Biol Regul Homeost Agents**. Milano, v. 30, n. 3, p. 785-788, Jul-Sep 2016.

SILVA, R. C., PARDINI, D.P., KATER, C.E. Síndrome dos ovários policísticos, síndrome metabólica, risco cardiovascular e o papel dos agentes sensibilizadores da insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 281-290, 2006.

SILVA, J. S. A.; UTIYAMA, S. R. R. Principais Auto-Anticorpos Envolvidos na Infertilidade Masculina e Feminina, com Ênfase nos Aspectos Clínicos e Laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Paraná, v. 37, n. 4, p. 233-238, 2005.

SUNKARA, S. K, Pundir J, Khalaf Y. Effect of androgen supplementation or modulation on ovarian stimulation outcome in poor responders: a meta-analysis. **Reprod Biomed Online**. London, v.22, n.6, p. 545-55, 2011.

TALAZAS, A. H, et al. *Tribulus terrestris*-induced severe nephrotoxicity in a young healthy male. **Nephrol Dial Transplant.**, Oxford, v.25 p. 3792–3793, 2010

VANACLOCHA, B. V., FOLCARÁ S.C. Fitoterapia: vademécum de prescripción. 4.ed. Barcelona: **Masson**. p. 1091, 2003.

VENDOLA, K, et al. Androgens promote insulina-like growth factor-I and insulina-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. **Hum Reprod.**; Oxford, v. 14 n. 9 p. 2328-32, 1999.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris L.* Na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 381-399, 2019.

VIGANÒ P, et al. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best Pract Res Clin Obstet Gynecol.**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 177-200, 2004.

WEIL S, et al. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. **J Clin Endocrinol Metab.** New York, v.84, n.8, p. 2951-6, 1999.

