

# AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL PELO TESTE DE PREFERÊNCIA A SACAROSE EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS TRATADOS COM EXTRATO DE *TRIBULUS TERRESTRIS* L.

*Behavioral evaluation by sucrose preference test in  
male swan mice treated with extract of  
*Tribulus terrestris* L.*

Lucas Roberto Moreira<sup>1</sup>  
Marcia Clélia Leite Marcellino<sup>1</sup>  
Thainá Valente Bertozzo<sup>1</sup>  
Jonatas Medeiros de Almeida Angelo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Sagrado  
Coração – Bauru/SP

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

## RESUMO

**Introdução:** O déficit de hormônios sexuais associa-se à depressão e, neste contexto, buscam-se plantas medicinais, como o *Tribulus terrestris* L. (TT). **Objetivo:** Investigar o efeito do declínio de testosterona, da suplementação com o propionato de testosterona e o TT no comportamento de animais. **Métodos:** O procedimento utilizou 40 camundongos suíços machos divididos em 4 grupos. Os

Recebido em: 25/04/2019  
Aceito em: 30/08/2019

grupos denominados controle e castrado receberam 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. O comportamento foi avaliado pelo teste de preferência a sacarose. Ao fim do experimento o sangue coletado para dosagem de testosterona livre. **Resultados e Discussão:** O processo cirúrgico como um todo e o uso do anestésico quetamina evidenciaram suposto efeito ansiogênico. **Conclusão:** A alteração hormonal causada pela castração, além do estresse da cirurgia e da complexa farmacologia do anestésico, possui a capacidade de alterar o comportamento dos animais.

**Palavras-chave:** Depressão. Teste de Preferência a Sacarose. Testosterona.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Sexual hormone deficiency is associated with depression, and in this context, medicinal plants such as Tribulus terrestris L. (TT) are sought.* **Objective:** *To investigate the effect of testosterone decline, supplementation with testosterone propionate and TT on animal behavior.* **Methods:** *The procedure used 40 male Swiss mice divided into 4 groups. The groups called control and castrated received an aqueous vehicle during the experiment. The testosterone group received 20 mg / kg of the drug and the Tribulus group received 10 mg / kg of the plant extract. The behavior was evaluated by the sucrose preference test. At the end of the experiment the blood collected for free testosterone dosage.* **Results and Discussion:** *The surgical process as a whole and the use of the anesthetic ketamine evidenced an anxiogenic effect.* **Conclusion:** *The hormonal alteration caused by castration, besides the stress of surgery and the complex pharmacology of the anesthetic, has the capacity to alter the behavior of the animals.*

**Key words:** *Depression. Sucrose Preference test. Testosterone.*

## INTRODUÇÃO

A depressão é uma síndrome que possui suas características bem definidas e se manifesta a partir de alterações neuronais. Tais alterações podem estar associadas à idade, uma vez que ocorre o declínio

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

funcional celular, situações cotidianas, estresse, entre outros (HIRSCHFIELD, 2002).

Biologicamente, suas causas se baseiam em hipóteses, sendo que, das principais, podemos citar a hipótese monoaminérgica, na qual ocorre um déficit funcional no sistema neurotransmissor trimonoaminérgico de maneira isolada ou em vários circuitos do cérebro; e a hipótese dos receptores monoaminérgicos, em que anormalidades nos mesmos causariam a depressão (RANG *et al.*, 2007; STAHL, 2010).

O diagnóstico da depressão é feito com base nos sintomas apresentados pelo paciente e, em alguns casos, indicadores biológicos podem auxiliar no mesmo, como é o caso do aumento de cortisol plasmático ou metabólitos de neurotransmissores presentes ou ausentes na urina (UMPHRED, 2004).

Existem diversas classes de fármacos para tratamento da depressão, tais como os antidepressivos tricíclicos, que inibem a recaptação das monoaminas do sistema neurotransmissor trimonoaminérgico; os inibidores seletivos, que diferem dos tricíclicos pela sua seletividade a uma ou duas monoaminas; os IMAO's (Inibidores da enzima monoaminoxidase); e os antidepressivos atípicos, que buscam aumentar as concentrações de dopamina e serotonina. Em todos os casos nota-se resultado do fármaco somente após um período que pode levar de duas a quatro semanas a partir do início da administração. Entretanto, o uso dos mesmos acarreta uma série de efeitos adversos, que variam de agitação, desassossego motor a redução da libido e disfunção sexual (STAHL, 1997, 2010; GOLAN, 2014).

Por poderem promover a disfunção sexual, busca-se correlações da depressão com o hormônio testosterona.

A testosterona é produzida pelas células de Leydig, que se localizam nos testículos, no interstício dos túbulos seminíferos, e sua secreção vem de estímulos do hipotálamo para a hipófise, que libera sinalizadores capazes de atuar principalmente nas gônadas (GRIFFIN, 2010). Tal hormônio é de extrema importância principalmente no organismo masculino, onde possui ação anabolizante e virilizante, além de auxiliar na absorção de uma gama de minerais e aumentar a taxa metabólica basal muscular (NELSON *et al.*, 2006; FREYBERGER *et al.*, 2009; SATTTLER *et al.*, 2009; GINZBURG *et al.*, 2010).

Aproximadamente aos sessenta anos de idade, o homem entra na condição de hipogonadismo tardio ou andropausa, em que os níveis de testosterona começam a declinar. Os sintomas são semelhantes aos da depressão, e alteram significativamente a qualidade de vida do homem. Sendo assim, atualmente ocorre uma grande procura por

suplementação com o hormônio sintético, entretanto ele pode causar efeitos indesejados, como hepatotoxicidade e hipotrofia dos testículos (ANDRADE JR. *et al.*, 2009).

Atualmente, a busca por produtos naturais para tratar as mais diversas condições é imensa, como no caso do *Tribulus terrestris* L., uma planta que possui a capacidade de alterar as concentrações séricas de testosterona. No entanto, seus mecanismos e efeitos sistêmicos ainda não foram completamente descritos (GAUTHAMAN, 2008).

Sendo assim, este estudo investigou o efeito comportamental do declínio de testosterona, mimetizado pela castração, da suplementação com o hormônio sintético e com o extrato de *Tribulus terrestris* L. no comportamento de camundongos suíços através do teste de preferência a sacarose.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - Animais e sua distribuição em grupos

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sagrado Coração, e foi aprovado sob parecer número 9871190216.

O estudo utilizou quarenta camundongos suíços, machos, com 120 dias. Os animais foram cedidos pelo biotério da Universidade do Sagrado Coração, onde permaneceram acondicionados durante os procedimentos. O ambiente foi sempre mantido entre 22 e 25°C, ciclo claro-escuro de 12 horas e constantemente limpo e arejado. Os animais foram acomodados em quatro gaiolas de polietileno, cada uma com dez animais, sendo assim denominados os grupos de estudo: Grupo Controle: que recebeu o veículo aquoso no qual as drogas foram diluídas no volume de 0,2 mL; Grupo Castrado: cujos integrantes, com 30 dias de vida, passaram por orquiectomia bilateral e, durante o experimento, receberam 0,2 mL do veículo aquoso; Grupo Testosterona: que recebeu 0,2 mL de propionato de testosterona na concentração de 20 mg/kg, sendo essa a dose usual para suplementação em indivíduos adultos; Grupo *Tribulus terrestris* L: que recebeu o extrato seco das flores da planta em volume de 0,2 mL e concentração de 10 mg/kg (GAUTHAMAN & GANESAN, 2008). As administrações foram realizadas durante trinta dias via gavagem.

O extrato seco das flores da planta foi comprado em uma farmácia de manipulação da cidade de Bauru, interior do estado de

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

São Paulo – Brasil, a qual forneceu laudo de autenticação e controle de qualidade.

## 2 - Orquiectomia bilateral

Para Andrade (2006) e CARVALHO *et al.* (2011), a partir dos sessenta dias de vida o animal torna-se apto à reprodução, embora o mesmo apresente características relacionadas aos hormônios sexuais a partir dos 30 dias de vida. Para mimetizar o declínio hormonal nos animais, os mesmos passaram pelo processo de orquiectomia bilateral, na qual o Grupo Castrado foi anestesiado com cloridrato de quetamina e xilazina (0,5:0,5) via intraperitoneal. Após o mesmo não apresentar mais respostas a estímulos nervosos, foi realizada a incisão de tamanho médio no abdome do animal, sendo assim pinçados e seccionados os testículos e o epidídimo. A sutura foi realizada com fio reabsorvível, e os animais foram acompanhados no pós-operatório, recebendo o antibiótico enrofloxacino 2,5% a 10 mg/kg, por via intramuscular. Para analgesia, dipirona sódica 0,5g/ mL foi aplicada via subcutânea na mesma proporção do antibiótico.

## 3 - Teste comportamental

O teste de preferência à sacarose busca mensurar a anedonia nos animais, ou seja, a perda da capacidade do mesmo em sentir prazer. Para a realização deste teste, foi considerado prazer solução de sacarose a 1% (WILLNER *et al.*, 1991).

Rotineiramente, cada gaiola possuía uma mamadeira. Para o teste, vinte e quatro horas antes da adição da solução de sacarose, uma segunda mamadeira era colocada na gaiola, sendo assim, os animais acostumavam-se a beber água de duas fontes. Tendo passado o dia de adaptação, uma das mamadeiras era trocada por solução de sacarose a 1%. Doze horas após, as mamadeiras eram invertidas de posição, para que os animais continuassem explorando. Após 24 horas com a solução de sacarose na gaiola, os volumes e pesos eram aferidos para cálculo do valor percentual de consumo e preferência a sacarose, de acordo com a fórmula: Preferência a sacarose =  $(\text{Consumo total de sacarose} / \text{Consumo total (água + sacarose)})$ , multiplicado por 100.

## 4 - Dosagem sérica de testosterona

Terminados os 30 dias de experimento, os animais foram eutanasiados com dose letal de Tiopental (150mg/Kg) e Lidocaína (10mg/Kg), tiveram o sangue coletado e enviado ao laboratório de análises clínicas da fundação Véritas para dosagem de testosterona livre.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise estatística pelo software Graphpad prism 5, considerando teste paramétrico T-Student ( $p < 0,05$ ), obteve-se que o Grupo Castrado teve um consumo maior de sacarose em relação aos outros grupos, conforme mostra o gráfico abaixo.

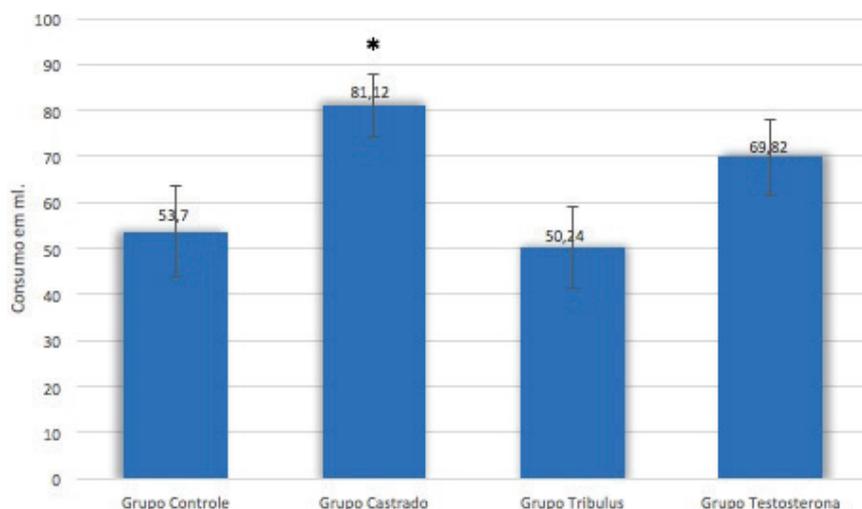


Figura 1 - Gráfico de comparação da média (em mililitros ou mL) do volume de solução de sacarose ingerido pelos animais do grupo controle (GC) e demais grupos de experimento (Castrado, Tribulus e Testosterona, respectivamente). \* Valores significativos ( $p < 0,05$ ) segundo Teste T-Student.

Uma menor anedonia, conforme apresentada pelo Grupo Castrado sugere-se efeito ansiolítico, potencialmente causado por eventos estressores, como a cirurgia e o processo pós-cirúrgico. Entretanto, de acordo com Leibenluft (2000), a quantia hormonal livre circulante está relacionada a transtornos mentais, corroborando os estudos.

Um dos anestésicos utilizados no processo cirúrgico foi a quetamina, que possui a capacidade de interagir com uma gama de neuroreceptores, como NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores serotoninérgicos, gabaérgicos, opióides e estudos sugerem sua interação

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

com a acetilcolina, noradrenalina e dopamina. Pode se dizer, portanto, que tem uma complexa farmacologia, mostrando que o mesmo pode estar relacionado ao aparecimento de transtornos mentais como ansiedade e depressão. Com isso, o suposto efeito ansiolítico apresentado pelo estudo pode ter relação com o anestésico quetamina (JICK *et al.*, 2004; GARCIA, 2007 *apud* SILVA, 2002).

Neste segundo gráfico, vemos as comparações entre os níveis séricos de testosterona apresentados nos respectivos grupos de estudo.

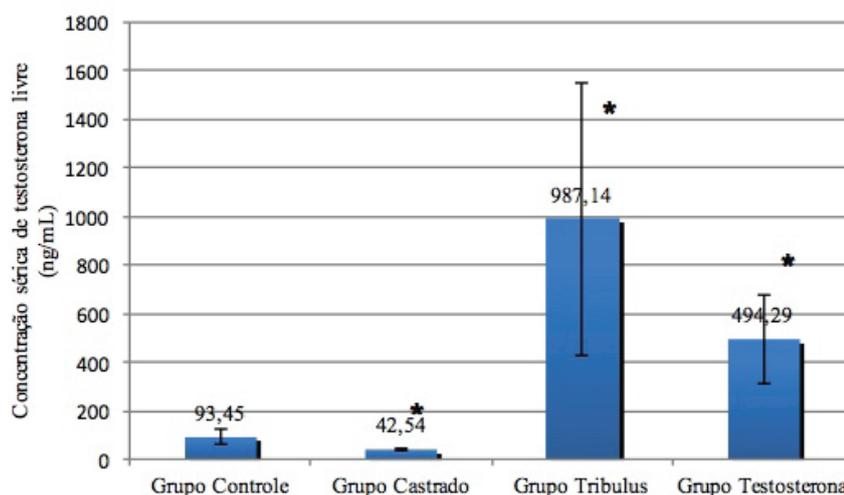


Figura 2 - Gráfico de comparação das médias de testosterona sérica entre os grupos de experimento. Teste T-Student ( $p < 0,05$ ) \* valores estatisticamente significativos.

Como esperado, o Grupo Castrado apresentou menor quantidade hormonal, por conta da orquiectomia bilateral, validando o procedimento.

Comparados ao controle, os Grupos Testosterona e Tribulus tiveram aumento significativo do hormônio. O Grupo Testosterona recebeu o propionato de testosterona, um fármaco que busca repor o hormônio, sendo assim, o aumento de testosterona nesse grupo corrobora o estudo de Santos (2003), expondo que o fármaco possui ação imediata. Para os autores Gauthaman & Ganesan (2008), o extrato da planta aumenta os níveis séricos de testosterona e outros hormônios em animais com disfunção erétil. Tal processo dar-se-ia pela presença de um componente chamado protodioscina, que se converte em DHEA (deidroepiandrosterona) e sofre ação da enzima 3-beta- hidroxisteroide ( $3\beta$ -HSD), convertendo-o em androstenediona, que é precursor do hormônio sexual testosterona. Sendo assim, este estudo corrobora tais citações.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por este estudo, confirmou-se que o processo de castração (orquiectomia bilateral) reduz a quantia sérica do hormônio sexual testosterona. Tal situação, associada ou não ao uso do anestésico que-tamina, ocasionou efeito ansiolítico nos animais do Grupo Castrado.

Em relação aos outros grupos, a planta não apresentou, estatisticamente, resultados significativos em transtornos do humor.

Evidencia-se a necessidade de novos estudos, com maior quantia de animais e por um período maior para comprovar os resultados, assim como a dosagem de hormônios hipofisários, como o FSH e LH, que atuam na produção de testosterona.

## AGRADECIMENTOS

Imensamente agradecido à Universidade do Sagrado Coração por proporcionar a oportunidade de desenvolver projetos de pesquisa tão valiosos à sociedade. Agradeço minha orientadora Profa. Ma. Marcia Clélia Leite Marcellino por todos os ensinamentos e lições de vida que foram passadas. Aos coautores, Thainá Bertozzo e Jonatas Angelo, agradeço todo o suporte e a oportunidade de trabalharmos e aprendermos juntos. Agradeço a equipe do biotério da Universidade por manter o local limpo e arejado, a Dra. Solange Franzolin pela ajuda na análise estatística. Agradeço também o apoio e suporte que as técnicas dos laboratórios Ligia e Fabiane forneceram. Por fim, agradeço meus pais pelo financiamento do projeto e pelo suporte oferecido.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE JR., 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, nov. 2009.

CARVALHO, C. A de.; FERNANDES, K. M.; MATTA, S. L. P. da; FONSECA, C. C.; PINTO, R.; OLIVEIRA, L. L. de. Aspectos macroscópicos e histológicos da mucosa gástrica de ratos wistar e sua utilização em modelo de úlceras gástricas. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, v.16, n.1, p.44-53, 2011.

FREYBERGER, A. E 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.

GINZBURG, E.; KLIMAS, N.; PARVUS, C.; LIFE, J.; WILLIX, R.; BARBER, M. J.; LIN, A.; COMITE, F. Long-term safety of testosterone and growth hormone supplementation: a retrospective study of metabolic, cardiovascular, and oncologic outcomes. **J Clin Med Res.** Québec, v 2 n 4 p 159–166, 2010.

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

GRIFFIN, D. K.; ELLIS, P.J.; DUNMORE, B.; BAUER, J.; ABEL, M. H.; AFFARA, N. A. 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.** Champaign, v 82, n 6, p 1139-1150, 2010.

HIRSHFELD, R. M. A.; MONTGOMERY, S. A.; AGUGLIA, E.; AMORE, M.; DELGADO, P. L.; GASTPAR, M.; HAWLEY, C.; KASPER, S.; LINDEN, M.; MASSANA, J.; MENDLEWICZ, J.; MÖLLER, H. J.; NEMEROFF, C. B.; SAIZ, J.; SUCH, P.; TORTA, R.; VERSIANI, M. Partial Response and Nonresponse to Antidepressant Therapy: Current Approaches and Treatment Options. **J Clin Psychiatry.** Memphis, v 63 n 9 p 826-837, 2002.

JICK, H., KAYE, J.A., JICK, S.S. Antidepressants and the risk of suicidal behaviors. **JAMA.** Chicago, v 21, n 292, p 338-343, 2004.

LEIBENLUFT, E. Gender Differences in Mood and Anxiety Disorders. **American Psychiatric Press;** Washington DC, v 157, n 7, p. 1186-1187, 2000.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo, Sarvier. 2006.

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

SANTOS, A. M. **O Mundo Anabólico: Análise do Uso de Esteroides Anabólicos no Esportes**. 2 ed. Barueri, SÃO Paulo: Manole. 2003.

SATLER, F. R.; CASTANEDA-SCEPPA, C.; BINDER, E. F.; SCHROEDER, E. T.; WANG, Y.; BHASIN, S.; KAWAKUBO, M.; STEWART, Y.; YARASHESKI, K. E.; ULLOOR, J.; COLLETTI, P.; ROUBENOFF, R. AZEN, S. P. Testosterone and growth hormone improve body composition and muscle performance in older men. **J Clin Endocrinol Metab**. Hyderabad, v 94 n 6 p 1991-2001, 2009.

SILVA, F. C. C. **Alterações comportamentais e envolvimento do estresse oxidativo provocadas por diferentes tratamentos com ketamina em camundongos** [tese]. Fortaleza, 2002.

STAHL, S. M. Psychopharmacology of Antidepressants. London: Martin Dunitz; **J Clin Psychiatry**, Memphis, v 59, p 5–14. 1997.

STAHL, M. S. **Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e aplicações práticas**. 4 ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2010.

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

WILLNER, P., MUSCAT, R., PAPP, M., STAMFORD, J., KRUK, Z. Dopaminergic mechanisms in an animal model of anhedonia. **European Neuropsychopharmacology**. Wien, v 1, n 3, p 295–296, 1991.

MOREIRA, Lucas Roberto *et al.* Avaliação comportamental pelo teste de preferência a sacarose em camundongos suíços machos tratados com extrato de *Tribulus terrestris* L. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 3, p. 655-664, 2019.