



DAVID RICHARD MIRANDA

**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS, BIOQUÍMICAS E
CORPORAIS DE RATOS SUPLEMENTADOS COM
EXTRATOS DE *Tribulus terrestris* E *Lepidium meyenii***

LAVRAS – MG

2019

DAVID RICHARD MIRANDA

**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS, BIOQUÍMICAS E CORPORAIS DE
RATOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATOS DE *Tribulus terrestris* E *Lepidium
meyenii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias *Stricto Sensu*, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientador

Prof. Dr. José Rafael Miranda

LAVRAS – MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Miranda, David Richard.

Características reprodutivas, bioquímicas e corporais de ratos
suplementados com extratos de *Tribulus terrestris* e *Lepidium
meyenii* / David Richard Miranda. - 2019.

61 p. : il.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangeronimo.

Coorientador(a): José Rafael Miranda.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Testículos. 3. Testosterona. I.
Zangeronimo, Márcio Gilberto. II. Miranda, José Rafael. III. Título.

DAVID RICHARD MIRANDA

**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS, BIOQUÍMICAS E CORPORAIS DE
RATOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATOS DE *Tribulus terrestris* E *Lepidium
meyenii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias *Stricto Sensu*, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de março de 2019.

Dr. José Rafael Miranda UFLA

Dra. Juliana Tensol Pinto UFLA

Dr. Eric Francelino Andrade UFVJM

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Orientador

LAVRAS – MG

2019

À minha mãe Meire Aparecida da Silva Miranda (in memoriam)

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luiz Carlos e Meire, por todo o esforço desde a minha infância para me proporcionar condições para chegar até aqui.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), que me proporcionou a graduação em Medicina Veterinária, em seguida a Residência Médica e agora o Mestrado.

À minha namorada e companheira Aline Costa da Silva, pelo amor e por estar ao meu lado nos bons e maus momentos.

Ao eterno Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa (*in memoriam*), exemplo de professor, pela orientação, ensinamentos e momentos de prosa. O Departamento de Medicina Veterinária não é mais o mesmo sem o senhor.

Ao Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo pela orientação, ensinamentos e valiosa ajuda na finalização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Rafael Miranda, sempre disposto a me ajudar, pela atenção, amizade e ensinamentos desde a minha graduação.

À Dra. Juliana Tensol Pinto por toda a ajuda no preparo dos extratos, nas análises sanguíneas e por aceitar prontamente ser membro da banca.

Ao Prof. Dr. Eric Francelino Andrade pela atenção, disponibilidade, contribuições e por aceitar prontamente ser membro da banca.

Ao Prof. Dr. Juliano Vogas Peixoto, pela amizade, pelas contribuições e oportunidades ao longo do Mestrado, em especial pelo convite para ser membro da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFLA.

Ao Daniel Martimiano, do Biotério Central Multiusuário da UFLA, pela amizade e ajuda no manejo dos animais.

Ao Isaac Koonig e Aline, do Laboratório de Morfologia Animal, pela ajuda na confecção das lâminas histológicas, e à Lara, aluna de graduação, pela ajuda nas análises histomorfométricas de testículo.

À doutoranda Bruna Resende Chaves, pela ajuda nas análises de sêmen.

Ao Sr. Willian, do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, por toda a ajuda ao longo desses dois anos.

À Maria Fátima de Almeida Ferreira (Dona Fátima), secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por sempre me atender com atenção e um sorriso no rosto em todas as vezes que precisei.

À todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária pelas conversas e momentos de descontração, em especial ao Seu Marcos, Marquinhos, Aparício, Dona Meire, Carla, Sebastião, Rose, D. Vilma e Seu Alexandre.

Aos ratos Wistar utilizados nesse trabalho. Sem eles nada disso teria sido possível.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada a bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da administração oral de extratos de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii* sobre parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais em ratos. Trinta e seis ratos Wistar machos com peso inicial de 210 ± 18 g foram divididos em seis grupos experimentais (n=6). Cada grupo recebeu diariamente, durante 28 dias, diferentes doses dos extratos secos de *T. terrestris* e *L. meyenii* dispersos em água destilada: *T. terrestris* na dose de 100mg/kg; *L. meyenii* na dose de 1g/kg e *T. terrestris* nas doses de 75, 50 e 25 mg/kg combinadas a *L. meyenii* nas doses de 0,25, 0,5 e 0,75g/kg, respectivamente, e água destilada (controle). O *T. terrestris* aumentou ($P < 0,05$) a concentração de testosterona no sangue, independente da dose. O uso das associações aumentou ($P < 0,05$) o diâmetro de ducto e de lúmen epididimário na cauda do epidídimo. Já as combinações de *T. terrestris* nas doses de 75 e 50mg/kg com *L. meyenii* nas doses de 0,25 e 0,5g/kg, respectivamente, aumentaram ($P < 0,05$) a concentração espermática. Não houve diferenças ($P > 0,05$) nas demais características seminais, no peso vivo, no peso relativo de fígado, baço, rins, epidídimos, índice gonadossomático, níveis séricos de ureia, creatinina, alanina transaminase, aspartato transaminase, gama glutamil transferase, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL), triglicérides, glicose, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante. Nenhuma alteração histopatológica foi observada nos grupos estudados. Conclui-se que a associação de *T. terrestris* e *L. meyenii*, em determinadas doses, apresentou efeito positivo sobre níveis séricos de testosterona, concentração espermática e morfologia epididimária, sem evidência de efeitos colaterais nos órgãos avaliados.

Palavras-chave: Machos. Plantas medicinais. Testículos. Testosterona. Espermatozoides.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the oral administration of extracts of *Tribulus terrestris* and *Lepidium meyenii* on reproductive, biochemical and body parameters in rats. Thirty-six male Wistar rats with initial weight of 210 ± 18 g were divided into six experimental groups (n = 6). Each group received daily, for 28 days, different doses of the dried extracts of *T. terrestris* and *L. meyenii* dispersed in distilled water: *T. terrestris* at a dose of 100mg/kg; *L. meyenii* at doses of 1g/kg and *T. terrestris* at doses of 75, 50 and 25mg/kg combined at doses of *L. meyenii* at 0.25, 0.5 and 0.75g/kg, respectively, and distilled water (control). *T. terrestris* increased (P <0.05) the testosterone concentration in the blood, regardless of dose. The use of the associations increased (P <0.05) the diameter of the duct and lumen epididymal in the tail of the epididymis. The combination of *T. terrestris* at doses of 75 and 50 mg/kg with *L. meyenii* at doses of 0.25 and 0.5g/kg increased significantly (P <0.05) the sperm concentration. There were no differences (P > 0.05) in the other seminal characteristics, live weight, weight relative to the liver, spleen, kidneys, epididymis, gonadosomatic index, serum levels of urea, creatinine, alanine transaminase, aspartate transaminase, gamma glutamyl transferase, total cholesterol and fractions (HDL, LDL, VLDL), triglycerides, glucose, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. No histopathological changes were observed in the groups studied. It was concluded that the association of *T. terrestris* and *L. meyenii* in certain doses had a positive effect on serum levels of testosterone, sperm concentration and epididymal morphology, without evidence of side effects in the evaluated organs.

Keywords: Males. Medicinal plants. Testicles. Testosterone. Spermatozoa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Foto de <i>T. terrestris</i> L.....	15
Figura 2 - Fruto do <i>T. terrestris</i> L.	16
Figura 3 - Estrutura química da protodioscina.	17
Figura 4 - Aspecto geral de <i>L. meyenii</i> Walp.	22
Figura 5 - Hipocótilo de <i>L. meyenii</i> Walp.	23

SEGUNDA PARTE

Figura 1 - Vista panorâmica do parênquima testicular de ratos Wistar tratados com diferentes doses de *T. terrestris* e *L. meyenii*, em associação ou isoladas. A: controle; B: *T. terrestris* 100mg/kg; C: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,25g/kg; D: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,5g/kg; E: *T. terrestris* 25mg/kg e *L. meyenii* 0,75g/kg; F: *L. meyenii* 1g/kg. 59

Figura 2 - Vista panorâmica do parênquima da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes doses de *T. terrestris* e *L. meyenii*, em associação ou isoladas. Observar maiores diâmetros de ducto e lume epididimário nos grupos C, D e E. A: controle; B: *T. terrestris* 100mg/kg; C: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,25g/kg; D: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,5g/kg; E: *T. terrestris* 25mg/kg e *L. meyenii* 0,75g/kg; F: *L. meyenii* 1g/kg. 60

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

- Tabela 1** - Peso vivo e peso relativo de vísceras de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*.55
- Tabela 2** - Parâmetros sanguíneos de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*.56
- Tabela 3** - Características reprodutivas de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*.57
- Tabela 4** - Dados de proporção testicular (percentual e volumétrica) de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm	Centímetro
DHT	Di-hidrotestosterona
DHEA	Dehidroepiandrosterona
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligrama
kg	Quilograma
g	Gramma
FSH	Hormônio folículo estimulante
µg	Micrograma
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
mm	Milímetro
°C	Celsius
DL ₅₀	Dose letal 50%
AST	Aspartato transaminase
UFLA	Universidade Federal de Lavras
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ml	Mililitro
ALT	Alanina transaminase
GGT	Gama glutamiltransferase
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
M	Molar
µm	Micrômetro

PBS

Phosphate buffered saline

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Uso de plantas com propriedades medicinais	14
2.2 <i>Tribulus terrestris</i> L.....	14
2.2.1 Descrição botânica do <i>T. terrestris</i>.....	14
2.2.2 Atividades farmacológicas do <i>T. terrestris</i>	16
2.3 <i>Lepidium meyenii</i> Walp	21
2.3.1 Descrição botânica da <i>L. meyenii</i> Walp	21
2.3.2 Atividades farmacológicas da <i>L. meyenii</i>.....	23
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERÊNCIAS	27
SEGUNDA PARTE - ARTIGO Uso de extrato de <i>Tribulus terrestris</i> e <i>Lepidium meyenii</i> em ratos: parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais	37
1. INTRODUÇÃO	389
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Local, animais e delineamento experimental	40
2.2 Caracterização dos extratos.....	40
2.3 Procedimento experimental	41
2.4 Análises sanguíneas	41
2.5 Análises histomorfométricas e histopatológicas.....	42
2.6 Avaliação espermática.....	43
2.7 Análise estatística.....	43
3 RESULTADOS	44
4 DISCUSSÃO	44
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS.....	61

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a farmacologia é baseada principalmente em compostos químicos sintéticos. Entretanto, a fitoterapia tradicional, que é utilizada há séculos, ainda desempenha um papel essencial na manutenção da saúde humana, seja por hábitos culturais bem como pela maior tolerabilidade, relativa disponibilidade e menor custo em relação a terapias convencionais. Dessa forma, é cada vez maior o interesse em explorar fitoterápicos com boa eficácia e baixa incidência de efeitos colaterais.

Uma variedade de produtos naturais, incluindo extratos brutos ou isolados de plantas, estão sendo estudados para a abordagem do tratamento de diversas doenças, dentre elas a infertilidade masculina. Grande parte dos homens com distúrbios de fertilidade apresentam níveis séricos de testosterona reduzidos e baixa qualidade seminal. Os efeitos das plantas medicinais nas funções reprodutivas do homem estão associados a compostos antioxidantes, visto que alguns afetam positivamente a espermatogênese e esteroidogênese. Também têm sido demonstradas atuações no sistema nervoso central ou periférico, melhorando a capacidade de resposta dos tecidos reprodutivos masculinos a neurotransmissores, regulação da síntese de óxido nítrico e hormônios sexuais, principalmente FSH, LH e testosterona.

O *Tribulus terrestris* é uma das principais plantas medicinais utilizadas no tratamento da infertilidade masculina. Saponinas esteroides presentes em seu fruto, em especial a protodioscina, podem ser convertidas em hormônios androgênicos nas gônadas e tecidos periféricos. Já a *Lepidium meyenii*, também conhecida como maca peruana, é tradicionalmente consumida nos Andes Centrais por aumentar a libido e a fertilidade. O hipocótilo, principal parte comestível da planta, apresenta alto valor nutricional e metabólitos secundários que estariam relacionados às suas propriedades androgênicas. Aumento sérico de testosterona e melhora de parâmetros seminais têm sido descritos após o consumo da planta em diferentes doses e períodos.

A associação de compostos bioativos presentes nessas plantas podem agir sinergicamente, potencializando suas propriedades medicinais, ou então reduzir ou neutralizar seus efeitos. Combinar diferentes extratos vegetais também possibilita a redução de doses, evitando assim casos de toxicidade pela ingestão de grandes quantidades de cada extrato quando administrado de maneira isolada. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da

administração de *T. terrestris* e *L. meyenii*, isoladas ou associadas, e em diferentes doses, sobre parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais em ratos Wistar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso de plantas com propriedades medicinais

Desde os primórdios o homem percebeu os efeitos curativos de determinadas plantas, notando que, de alguma forma sob a qual o vegetal medicinal era administrado (pó, chá, banho e outros), proporcionava-se a recuperação da vitalidade do indivíduo (MATOS, 1999). Nas últimas décadas, o uso de fitoterápicos aumentou significativamente. Tal aumento é justificado pelos avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, e pela população buscar terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (BRUNING et al., 2012).

Fitoterápicos são produtos extraídos de sementes, gomas, raízes, folhas, cascas, frutos ou flores. Tais produtos contêm vários compostos fitoquímicos como ácidos fenólicos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas e lignanas, proporcionando diversos benefícios para a saúde (SELAMMI et al., 2018). Logo, as plantas medicinais são consideradas fontes ricas de componentes para a síntese e desenvolvimento de novos fármacos fundamentais para a manutenção da saúde humana e animal (SINGH, 2015).

Apesar disso, a efetividade e toxicidade dos fitoterápicos têm sido questionadas graças ao uso indiscriminado e exacerbado. O desconhecimento pelos consumidores sobre as informações mínimas necessárias ao uso correto de plantas medicinais e seus derivados, e as dificuldades encontradas pelos profissionais da saúde para obtenção de informações de qualidade, tornam a fitoterapia um alvo fácil para a automedicação sem responsabilidade (ALEXANDRE et al., 2005). Assim, estudos são necessários para uma avaliação crítica das propriedades farmacológicas das plantas, suas contraindicações e possíveis efeitos adversos.

2.2 *Tribulus terrestris* L.

2.2.1 Descrição botânica do *T. terrestris*

O gênero *Tribulus*, pertencente à família *Zygophyllaceae*, compreende mais de 20 espécies distribuídas ao redor do mundo, destacando-se o *T. cistoides*, *T. alatus* e *T. terrestris*, sendo esse último de maior importância. O *T. terrestris* é comumente conhecido como tribulus, videira da punctura, videira amarela, viagra natural, cabeça de touro, cabeça de cabra, espinho

do diabo, *caltrop*, *Gokharu*, *Bethagokharu*, *Nanagokharu* entre outros (KOSTOVA; DINCHEV, 2005; PHILLIPS et al., 2006; KOKATE et al., 2007; CHHATRE et al., 2014). Encontra-se amplamente distribuído em toda África, parte ocidental da Ásia, sul da Europa, Índia, Sri Lanka, Paquistão, Bulgária, Japão, China, Espanha e México (AL-ALI et al., 2003; SHARIFI et al., 2003; CHHATRE et al., 2014).

O *T. terrestris* é um pequeno arbusto que cresce anualmente no verão, atingindo cerca de 10 a 60cm de altura. Suas folhas são pequenas e opostas, paripinadas e, muitas vezes, desiguais. As flores são pequenas e amareladas, contendo cinco pétalas cada uma (Figura 1). Os frutos apresentam forma estrelada, levemente arredondada (Figura 2), medindo 1cm de diâmetro e 0,5cm de comprimento, contendo espículas proeminentes, duras e curtas, com quatro ou mais sementes e sabor adstringente. As sementes são de natureza oleosa. Possui raiz delgada e cilíndrica de cerca de 7 a 18cm de comprimento e 0,3 a 0,7cm de diâmetro, frequentemente ramificada em uma série de pequenas raízes de coloração amarela a marrom clara (FARMACOPÉIA AYUVÉRDICA INDIANA, 2001; CHHATRE et al., 2014).

Figura 1 - Foto de *T. terrestris* L.



Fonte: Samy et al. (2012).

Figura 2 - Fruto do *T. terrestris* L.

Fonte: Akram et al. (2011).

O *T. terrestris* cresce bem em solos de textura leve, entretanto, consegue se desenvolver em vários tipos de terreno, podendo ser encontrado em áreas cultivadas, pastagens, estradas, gramados e áreas negligenciadas (HASHIM et al., 2014). Devido à natureza espinhosa de seus frutos é considerada uma ameaça aos animais de pastoreio (BOURKE et al., 1992).

2.2.2 Atividades farmacológicas do *T. terrestris*

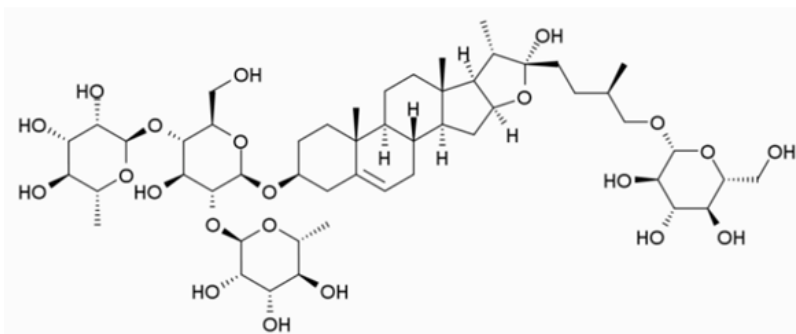
Ao longo dos anos, pesquisas comprovaram atividades farmacológicas do *T. terrestris* como melhora da função sexual e afrodisíaca (ADIMOELJA; ADAIKAN, 1997; SINGH et al., 2012; ROAIAH et al., 2015), cardioproteção (ZHANG et al., 2010), aumento do desempenho em atividades físicas (MILASIUS et al., 2010; YIN et al., 2016), efeitos anti-urolíticos (ANAND et al., 1994; AGGARWAL et al., 2012), ação antidiabética (AMIN et al., 2006; LAMBA et al., 2011), anti-hipertensiva (SHARIF et al., 2003; PHILIPS et al., 2006), anti-inflamatória (BABURAO et al., 2009; LEE et al., 2017), imunomoduladora (TILWARI et al., 2011), analgésica (HEIDARI et al., 2007), antiespasmódica (ARCASOY et al., 1998), antioxidantes (PANDEY et al., 2007), diurética (AL-ALI et al., 2003; CHHATRE et al., 2012), hipolipidêmica (TUNCER et al., 2009; KHAN et al., 2011), antibacteriana (AL-BAYATI; AL-MOLA, 2008; MOHAMMED, 2008), antifúngica (ZHANG et al., 2006a), anti-helmíntica (DEEPAK et al., 2002), larvicida (SINGH et al., 2008), hepatoprotetora (KAVITHA et al., 2011; SUGUNAVARMAN; JAGADEESAN, 2013), neuroprotetora (ZHAI et al., 2015), antidepressiva e ansiolítica (DEOLE et al., 2011), anticariogênica (OH et al., 2011) e antitumoral (SISTO et al., 2012). Esses efeitos se devem à presença de diversos compostos

químicos com uma variedade de propriedades biológicas. Tais compostos incluem saponinas esteroides, flavonoides, glicosídeos, fitoesteróis, taninos, terpenoides, derivados de amida, aminoácidos e proteínas. Dentre esses compostos, saponinas esteroides e flavonoides são considerados os metabólitos mais importantes (ZHU et al., 2017).

A ingestão de *T. terrestris* pode elevar os níveis séricos de hormônios androgênicos como testosterona, di-hidrotestosterona (DHT) e dehidroepiandrosterona (DHEA), estimulando a espermatogênese e promovendo aumento da libido, melhora da qualidade espermática e ganho de massa muscular. Acredita-se que ocorra a conversão de um de seus derivados fitoquímicos, a protodioscina (Figura 3), principal saponina presente na planta, em DHEA, já que suas estruturas químicas são muito semelhantes (ADIMOELJA, 2000; KOSTOVA; DINCHEV, 2005). A protodioscina também atuaria estimulando a produção da enzima 5- α -redutase, a qual converte testosterona em DHT (ARYSAD, 1996).

Outra teoria proposta é que a protodioscina induza um aumento da produção endógena de andrógenos ao aumentar a liberação de hormônio luteinizante (LH) pela glândula pituitária (ADAIKAN et al., 2001). A suplementação de 6mg/kg/dia de extrato aquoso de *T. terrestris* em ratos *Sprague Dawley* durante oito semanas elevou os níveis séricos de LH (HAMID et al., 2017). Embora estudos experimentais e clínicos tenham confirmado parcialmente alguns efeitos do *T. terrestris* sobre parâmetros corporais e reprodutivos, ainda há divergências sobre possíveis mecanismos de ação e suas aplicações terapêuticas (MARTINO-ANDRADE et al., 2010).

Figura 3 - Estrutura química da protodioscina.



Fonte: Shishovska et al. (2015).

A administração de 70mg/kg/dia de *T. terrestris* por 20 dias aumentou o peso corporal de ratos albinos jovens (BASHIR et al., 2009). Maior ganho de peso também foi observado em ratos *Sprague Dawley* que receberam a administração da planta na dose de 10mg/kg/dia durante

oito semanas (GAUTHAMAN et. al, 2002). Estudos também têm mostrado aumento de peso em ratos machos fornecendo-se outras doses de extratos da planta (2,5, 5, 42, 110 e 120mg/kg) (GAUTHAMAN; GANESAN, 2008; MARTINO-ANDRADE et al., 2010). Acredita-se que o ganho de peso em ratos tratados com *T. terrestris* ocorra devido ao seu efeito androgênico, produzindo um estímulo para aumento do apetite e conseqüente incremento de massa corporal (GAUTHAMAN et al., 2003).

Devido aos seus efeitos ergogênicos, o *T. terrestris* tornou-se um suplemento nutricional extremamente popular entre os atletas (ROGERSON et al., 2007). Tais efeitos atribuídos à planta se devem à capacidade de elevar os níveis séricos de testosterona, resultando em estímulo para hipertrofia da musculatura esquelética. Seu uso foi especialmente promovido na Bulgária a partir da década de 1970 onde foram observadas melhoras no desempenho físico de atletas, principalmente em levantadores de peso. Entretanto, exames *antidoping* vieram a detectar o uso de esteroides anabolizantes por muitos desses esportistas (POKRYWKA et al., 2014).

Ratos Sprague Dawley foram submetidos a um modelo de *overtraining* e suplementados ou não com 120mg/kg/dia de extrato de *T. terrestris* por seis semanas. Os animais submetidos apenas ao exercício físico intenso apresentaram diminuição nos níveis séricos de testosterona, enquanto que nos animais suplementados com a planta foram constatados aumento de massa corporal e níveis séricos de testosterona, além de maior tempo de exercício até a exaustão (YIN et al., 2016). O consumo de 625mg pela manhã e 1250mg à noite de *T. terrestris* por atletas jovens entre 20 a 22 anos durante 20 dias aumentou a concentração sérica de testosterona a partir do décimo dia de uso, bem como proporcionou um efeito positivo na capacidade aeróbia e anaeróbica desses atletas (MILASIUS et al., 2010). O ganho de força e massa muscular promovido pelo *T. terrestris* estaria relacionado à produção de LH e conseqüentemente de testosterona, resultando no desenvolvimento mais acentuado de caracteres masculinos, além de melhorar a circulação sanguínea e transporte de oxigênio (ARSYAD, 1996).

Contudo, vários estudos publicados na literatura contradizem tais resultados, bem como sua capacidade de elevar os níveis séricos de hormônios androgênicos em homens. Homens com idade entre 20 e 36 anos que receberam 10 ou 20mg/kg/dia de *T. terrestris* por quatro semanas não apresentaram incrementos nos níveis séricos de testosterona, androstenediona e LH mensurados antes e após 24, 72, 240, 408 e 576 horas do início da suplementação (NEYCHEV; MITEV, 2005). Níveis séricos de LH e testosterona também não sofreram alterações após duas semanas em homens que consumiram quatro cápsulas ao dia de extrato comercial da planta (Triandrol[®]) (ROGERSON et al., 2004). Atletas de elite de *rugby* não apresentaram mudanças significativas em força, ganho de massa muscular magra e na relação

de excreção urinária testosterona/epitestosterona após cinco semanas de uso de 450mg/dia de extrato seco da planta (ROGERSON et al., 2007). Então, nesses trabalhos, o *T. terrestris* não influenciou a produção de andrógenos. Tais divergências de resultados podem ser atribuídas aos diferentes teores de compostos fitoquímicos da planta de acordo com a região geográfica de origem, variabilidade individual, tempo de administração e aos diferentes tipos de extratos utilizados em cada estudo (DINCHEV et al., 2008; MARTINO-ANDRADE et al., 2010).

Diversas pesquisas apresentam efeitos benéficos do *T. terrestris* sobre a espermatogênese e parâmetros seminais. Análises histomorfométricas demonstraram aumento considerável no número de espermátides, espermatozoides, células de *Leydig* e diâmetro de túbulos seminíferos em camundongos que receberam 2mg/kg/dia de *T. terrestris* por 14 dias (AL-YAWER et al., 2008). O consumo de extrato aquoso da planta pelo mesmo período, porém nas doses de 50 e 100mg/kg/dia, elevou a contagem espermática em ratos Wistar (SINGH et al., 2012). Maior concentração e menor porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas foram observados em ratos suplementados com 5mg/kg/dia de *T. terrestris* por oito semanas (ELAHI et al., 2013). Esses achados foram atribuídos ao poder androgênico de suas saponinas, em especial a protodioscina.

Três dosagens diferentes (11, 42 e 110mg/kg/dia) de *T. terrestris* foram fornecidas a ratos Wistar machos intactos e orquiectomizados e em fêmeas ovariectomizadas. A administração de *T. terrestris* aos machos intactos não alterou os níveis séricos de testosterona, diâmetro médio e altura de epitélio de túbulos seminíferos, pesos absolutos e relativos de testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, fígado, rins e glândulas adrenais. Também não foi evidenciado nenhum efeito relevante nos machos castrados e fêmeas castradas. Esses achados demonstraram que a planta não foi capaz de estimular tecidos hormônio-responsivos, indicando uma possível falta de atividade androgênica e estrogênica *in vivo*. Entretanto, foi observado maior número de espermátides em ratos intactos tratados com 11 mg/kg/dia (MARTINO-ANDRADE et al., 2010). Segundo os autores, a razão para o aumento com a dose mais baixa é desconhecida. No entanto, em farmacologia, é comum observar dose-respostas não-monotônicas com efeitos significativos em menores doses e nenhum efeito (ou efeitos opostos) em doses mais altas (WELSHONS et al., 2003; ANDRADE et al., 2006). Extratos de plantas contém vários fitoconstituintes que podem interagir de maneiras diferentes (BELZ, 2007). Esse fato pode justificar a diversidade de resultados encontrados na literatura com o uso de *T. terrestris*.

Homens portadores de deficiência androgênica consumiram 750mg/dia de *T. terrestris* ao longo de três meses. Ao término do tratamento foram observados aumentos nos níveis

séricos de testosterona total e livre, sem alterações em LH (ROAIAH et al., 2015). Resultados semelhantes foram evidenciados em homens inférteis que fizeram uso de *T. terrestris* (Androsten[®]) na mesma dosagem e pelo mesmo período. Os níveis séricos de DHEA, testosterona livre, FSH, LH e prolactina não foram alterados. No entanto, os níveis de DHT aumentaram significativamente, assim como a concentração e motilidade espermáticas. Em outro estudo, a administração de Libilov[®] (protodioscina) em pacientes com oligozoospermia idiopática aumentou a concentração e motilidade espermáticas e número de espermatozoides normais em 80% dos homens testados (ARYSAD et al., 1996). A partir desses resultados, conclui-se que o *T. terrestris* pode ser útil no tratamento da disfunção sexual masculina.

Outras espécies também serviram de modelo animal para avaliar as propriedades androgênicas do *T. terrestris*. Carneiros das raças Pleven Blackhead e Abacii em estação de monta receberam 1,5g/dia de extrato da planta por 40 dias, sendo observados ejaculados com maiores concentração e sobrevivência espermáticas (KISTANOVA et al., 2005). A administração de 5 ou 10mg/kg/dia durante oito semanas de extrato de *T. terrestris* em coelhos da raça Nova Zelândia elevaram os níveis séricos de DHT e, em ratos Sprague Dawley, uma única administração intravenosa de 7,5mg/kg de extrato de *T. terrestris* aumentaram os níveis séricos de testosterona, DHT e sulfato de deidroepiandrosterona (DHEAS) (GAUTHAMAN; GANESAN, 2008). Todos os resultados foram atribuídos à protodioscina.

Outra propriedade do *T. terrestris* que vem sendo estudada é sua ação hipolipidêmica. Acredita-se que a presença de compostos fenólicos em seus frutos eleve os níveis musculares da lipase lipoproteica, estimulando o uso de triglicérides para a produção de energia. Também poderia estimular o aumento dos teores séricos de HDL, o qual desempenha um papel fundamental na remoção de colesterol de tecidos periféricos para o fígado (DEL-BAS et al., 2005; KHAN et al., 2011). Nesse sentido, coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica e suplementados com *T. terrestris* (5mg/kg/dia) durante oito semanas apresentaram redução nos níveis séricos de HDL, LDL e triglicérides (TUNCER et al., 2009). A administração de 580mg/kg/dia de extrato aquoso por 30 dias em ratos reduziu a hiperlipidemia induzida por colesterol, apresentando menores níveis séricos de colesterol total, triglicérides, LDL, VLDL, além de aumento nos níveis sanguíneos de HDL (KHAN et al., 2011). Entretanto, outros trabalhos não encontraram diferenças significativas nos níveis séricos de colesterol e frações e triglicérides após o uso da planta em doses de 750 mg/dia por três semanas (ADIMOELJA; ADAIKAN, 1997) e 1000mg/dia pelo período de três meses (SAMANI et al., 2016).

A ação hipoglicemiante também tem sido observada em alguns estudos com *T. terrestris* (LI et al., 2002; SU et al., 2009; EL-SHAIBANY, 2015; GHANBARI et al., 2016). Esses

resultados podem ser atribuídos à grande quantidade de saponinas presente na planta, além de alcaloides β -carbolínicos como harmano e norharmano, os quais estimulariam a secreção de insulina (EL-SHAIBANY et al., 2015). Flavonoides como kaempferol, quercetina e rutina também são capazes de induzir maior secreção insulínica e conferir proteção às células β -pancreáticas contra episódios de estresse oxidativo. Esses compostos também aumentariam o consumo de glicose periférica pela musculatura esquelética (ADEWOLE et al., 2006; JO et al., 2009).

Por outro lado, efeitos adversos da suplementação de *T. terrestris* são raros e, na maioria das vezes, insignificantes (SIVAPALAN et al., 2016). Segundo os autores, alguns pacientes relataram desconforto estomacal ou distúrbio gastrointestinal, porém, esses foram minimizados quando a planta foi ingerida junto a algum alimento. Nenhuma alteração cardiovascular e em sistema nervoso central foi relatada em ensaios clínicos (WANG et al., 1997; ZHANG et al., 2010; DEOLE et al., 2011). Um caso de hepatotoxicidade, insuficiência renal aguda e convulsões foi relatada em um jovem irariano após o consumo de *T. terrestris* (TALASAZ et al., 2010), provavelmente devido a superdosagem e/ou contaminação do extrato. Sinais de síndrome hepatorenal e neurotoxicidade também foram relatados em cabras e ovelhas em áreas de pastejo que continham a planta (ASLANI et al., 2003; ASLANI et al., 2004). A DL₅₀ estabelecida em camundongos é de 19,8g/kg (AL-ALI et al., 2003). Dessa forma, estudos tornam-se necessários para avaliar a segurança do consumo de *T. terrestris*.

2.3 *Lepidium meyenii* Walp

2.3.1 Descrição botânica da *L. meyenii* Walp

A planta *Lepidium meyenii* Walp, popularmente conhecida como maca peruana, pertence à família *Brassicaceae* e cresce entre 4000 e 4500m acima do nível do mar, na região central dos Andes (GONZALES et al., 2006). A família *Brassicaceae* compreende mais de 2500 espécies e mais de 350 gêneros, incluindo vegetais populares como o brócolis e a couve-flor. O termo *Lepidium* deriva-se do grego “*Lepidion*”, que significa “pequena escala”, nome dado por Dioscórides a pequenos frutos desse gênero cosmopolita que inclui cerca de 130 espécies (BRAKO; ZARUCHI, 1993).

A primeira descrição botânica da *L. meyenii* foi realizada pelo biólogo alemão Wilhelm Gerhard Walpers, em 1843, baseada no espécime coletado em um lugarejo chamado Meyeni, do Departamento de Puno, Peru. Entretanto, acredita-se que seja cultivada pelo povo peruano há cerca de 1300 a 2000 anos (CHACÓN DE POPOVICI, 1990; VALERIO; GONZALEZ,

2005). Apesar de ser nativa do Peru também se encontra distribuída pela Bolívia, Colômbia, Chile e Argentina (CÁRDENAS, 2005).

A *L. meyenii* apresenta-se na fase vegetativa como uma pequena roseta de folhas, tornando-se maior na fase generativa, quando passa a ser composta por folhas, flores e raiz (Figura 4). Suas hastes são ramificadas medindo cerca de 3 a 10cm de comprimento e folhas dimórficas. Os frutos são silíquas de 4 a 5mm de comprimento, deiscentes, com duas cavidades cuneiformes, cada uma contendo uma semente. A principal parte comestível da planta é um tubérculo parecido com um rabanete constituído pelo hipocótilo (Figura 5) e raiz. Essa última, geralmente de forma cônica, pode atingir cerca de 18cm de comprimento e 6,5cm de diâmetro. As dimensões das raízes variam bastante, sendo as de tamanho médio as mais apreciadas pelas populações indígenas. A cor da raiz varia de branca a preta. A planta necessita de um solo rico em material orgânico e ácido e temperaturas entre -1,5 a 12°C para seu crescimento (TELLO et al., 1992; BIANCHI, 2003; GONZALES et al., 2009).

Figura 4 - Aspecto geral de *L. meyenii* Walp.



Fonte: Dostert et al. (2013).

Figura 5 - Hipocótilo de *L. meyenii* Walp

Fonte: Dostert et al. (2013).

2.3.2 Atividades farmacológicas da *L. meyenii*

Convencionalmente os hipocótilos da *L. meyenii* têm sido usados há séculos, principalmente como fonte alimentar e medicinal. Na medicina tradicional peruana, a planta é utilizada para aumentar a vitalidade e fertilidade, promover a libido e o desempenho sexual em homens e mulheres (GONZALES et al., 2013).

No período pré-colombiano, os Incas a consideravam um alimento nobre enviado pelos deuses para nutrir e aumentar a energia e vitalidade dos seus guerreiros (HERMANN; HELLER, 1997). Outras propriedades medicinais atribuídas à planta incluem redução da hiperplasia prostática benigna (GONZALES et al., 2012), atenuação de sintomas da menopausa (LEE et al., 2011), anti-osteoporose (ZHANG et al., 2006b; GONZALES et al., 2010), antidepressiva (STOJANOVSKA et al., 2015), antiestresse (LOPEZ-FANDO et al., 2004; TAPIA et al., 2000), antifadiga (LI et al., 2017; YANG et al., 2016), imunomodulação (WANG et al., 2016), neuroproteção (ALMUKADI et al., 2013) e melhora no humor e aumento de energia (GONZALES-ARIMBORGO, 2016).

O valor nutricional da *L. meyenii* é tão alto quanto o do milho, arroz e trigo (LI et al., 2001). Os hipocótilos secos contêm entre 13 e 16% de proteína e os frescos contêm cerca de 80% de água e quantidades elevadas de ferro e cálcio. A planta é rica em aminoácidos como leucina, arginina, fenilalanina, lisina, glicina, alanina, valina, isoleucina, ácido glutâmico, serina e ácido aspártico. Outros aminoácidos presentes, porém em menor proporção, são histidina, treonina, tirosina, metionina, hidroxiprolina, prolina e sarcosina. Os ácidos linoleico,

palmítico e oleico são os ácidos graxos livres mais abundantes. Outros minerais encontrados são o potássio, cobre e zinco (DINI et al., 1994; VALERIO; GONZALES, 2005; GONZALES, 2012).

Os constituintes químicos da *L. meyenii* que estão relacionados com a ação terapêutica na melhoria da saúde sexual e fertilidade são os polifenóis, fitoesteróis, fitoestrógenos, alcalóides (lepididinas A e B, macaridina), ácidos graxos (macaeno) e amidas (macamidas). Ainda, as diferenças nas proporções de metabólitos secundários entres as variedades de cor de seus hipocótilos podem explicar as diferentes propriedades biológicas descritas para a planta (GONZALES, 2010; GONZALES, 2012).

Um levantamento foi realizado para determinar o estado de saúde da população de *Carhuamayo*, na região dos Andes Centrais do Peru, situada a 4100m do nível do mar. A partir das análises dos questionários respondidos foi constatado que 80% dos moradores consomem *L. meyenii*, principalmente uma mistura de variedades de hipocótilos naturalmente desidratados, sob a forma de sucos e, 85% destes a consomem por razões nutricionais. O consumo da planta foi associado a melhores índices de estado de saúde, menores taxas de fraturas ósseas e sintomas de doença crônica das montanhas, além de menores índices de massa corporal e pressão arterial sistólica (GONZALES, 2010).

Assim como o *T. terrestris*, a *L. meyenii* também tem sido alvo de pesquisas sobre suas propriedades androgênicas. O uso de 66,7mg em extrato aquoso por 14 dias aumentou o peso de testículos e epidídimos e a duração e frequência dos estágios IX a XIV dos túbulos seminíferos em ratos (GONZALES et al., 2001a). Já a administração de 1g/kg de extrato de *L. meyenii* (variedade amarela) por uma semana aumentou o comprimento dos estágios VII e VIII dos túbulos seminíferos, além de maior concentração espermática em ratos de três meses de idade (CHUNG et al., 2005). Animais da mesma espécie que também receberam 1g/kg de extrato aquoso pelo mesmo período, porém dessa vez da variedade preta, apresentaram maior contagem espermática e área tubular de epidídimo (GASCO, 2007). Diante de tais resultados, infere-se que a planta possa modular a espermatogênese devido ao seu alto valor nutricional e compostos antioxidantes.

Estudos utilizando extratos de *L. meyenii* em ratos machos em diferentes doses e períodos de administração não apresentaram efeito sobre os níveis sanguíneos de testosterona (CHUNG et al., 2005; GONZALES et al., 2005, 2006; RUBIO et al., 2006; GASCO et al., 2007). Entretanto, o consumo por seis semanas de dieta padrão acrescida de 2% de extrato hidroalcoólico da planta elevou a concentração sérica de testosterona e área citoplasmática de células de *Leydig* em ratos. Por outro lado, não foram observadas diferenças nos níveis séricos

de LH, sendo necessários mais estudos para elucidar o efeito da planta sobre a secreção de LH e testosterona (OHTA et al., 2016).

Os níveis séricos de FSH, LH e testosterona não sofreram alterações em homens que consumiram 1500 ou 3000 mg/dia de *L. meyenii* durante 12 semanas (GONZALES et al., 2003; MELNIKOVOVA, 2015). O uso das mesmas dosagens por homens entre 22 e 44 anos durante quatro meses promoveram aumentos de volume seminal, contagem e motilidade espermáticas, porém, também sem diferenças nas concentrações sanguíneas de FSH, LH e testosterona (GONZALES et al., 2001b). Dessa forma, a ação da maca peruana parece ser apenas em nível de trato reprodutivo, muitas vezes não alterando os níveis de hormônios androgênicos (GONZALES et al., 2003).

O efeito da *L. meyenii* sobre a expressão gênica de receptores, proteínas reguladoras e enzimas esteroidogênicas foi avaliado em testículos de ratos. Os animais receberam dietas contendo extrato da planta em pó (2%) por seis semanas. Maiores níveis testiculares de mRNA do gene *HSD3B1* (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 3 β -HSD) foram observados nos animais tratados (OHTA et al., 2017). Segundo os autores, o aumento da atividade de 3 β -HSD pode elevar a concentração de androstenediona, um precursor da testosterona, sendo essa a possível razão da capacidade esteroidogênica da planta em testículos de ratos.

A *L. meyenii* possui atividade protetora frente a danos oxidativos que promovem lesões testiculares. A administração de 500 ou 1000mg/kg/dia da planta durante 28 dias em camundongos que receberam 150mg/kg/dia de ciclofosfamida por dois dias resultou em atenuação significativa dos danos testiculares induzidos pelo quimioterápico, além de maiores níveis séricos de testosterona, diâmetro e altura de epitélio de túbulos seminíferos (ONOLAPO et al., 2017). Os danos espermatogênicos causados pelo organofosforado malathion foram significativamente reduzidos em camundongos tratados com 2g/kg/dia do extrato aquoso da planta durante 7, 14 ou 21 dias (BUSTOS-OBREGÓN et al., 2005). Os efeitos antioxidantes da *L. meyenii* têm sido atribuídos à presença de metabólitos secundários como flavonoides, fenóis, glucosinolatos, alcaloides e polissacarídeos (GONZALES, 2012).

É sabido que a exposição a altas altitudes (4340m) resulta em distúrbios testiculares no homem. Tais alterações compreendem degeneração do epitélio germinativo e interrupção da espermatogênese (DONAYRE, 1969; GONZALES et al. 1990; SAXENA, 1995). Diante desse fato, um estudo foi desenvolvido para determinar se a ingestão de *L. meyenii* impediria o efeito deletério da altitude sobre a espermatogênese. Ratos que receberam 666,6mg/dia de extrato aquoso da planta durante 7, 14 ou 21 dias apresentaram maiores níveis séricos de testosterona após sete dias em alta altitude (4320m) em relação ao grupo não tratado pelo mesmo período.

A exposição à altitude elevada reduziu a contagem espermática epididimária em todos os tempos de avaliação. Esse efeito não foi observado nos ratos que receberam o extrato da planta (GONZALES et al., 2004).

Outra propriedade medicinal estudada da *L. meyenii* é sua atividade hipoglicemiante. Redução da glicemia foi observada com o uso de 1g/kg de extrato hidroalcoólico da planta durante sete dias em camundongos induzidos à *diabetes mellitus* (GONZALES et al., 2013). Ratos hereditários hipertrigliceridêmicos da linhagem Wistar que receberam dieta rica em sacarose contendo *L. meyenii* (1%) por duas semanas apresentaram menor glicemia, colesterol total, LDL e VLDL no sangue. Fitoconstituintes presentes em seus hipocótilos seriam os responsáveis pelos efeitos observados, entretanto, seus mecanismos de ação ainda não são bem compreendidos. Tais resultados sugerem que o uso da planta como suplemento alimentar também seria útil no tratamento de pacientes diabéticos e com perfil elevado de lipoproteínas aterogênicas (VECERA et al., 2007).

Durante todos os anos em que a *L. meyenii* tem sido usada nos Andes Peruanos, nenhum efeito tóxico tem sido relatado desde que consumida após a fervura (VALERIO; GONZALES, 2005). Ratos tratados cronicamente com 1g/kg/dia por 84 dias não apresentaram efeitos colaterais. Nesse estudo, as análises histomorfológicas do fígado foram semelhantes ao do grupo controle. As doses usuais de 1 a 2g/kg/dia administradas em ratos são seguras (GASCO et al., 2007) e a DL₅₀ da planta para a espécie é superior a 15g/kg (MEISSNER et al., 2006). Doses de 1,5 a 3,0g/dia administradas em homens foram consideradas seguras (GONZALES et al., 2003). Entretanto, a administração de 0,6g/dia por 90 dias em pacientes com síndrome metabólica resultou em elevação moderada de aspartato transaminase (AST) e pressão arterial diastólica (VALENTOVÁ et al., 2008).

Até o presente momento não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem o uso conjunto de *T. terrestris* e *L. meyenii* sobre parâmetros corporais, bioquímicos e reprodutivos em ratos Wistar. É possível que a associação das duas plantas possa resultar em efeitos positivos aditivos sobre tais parâmetros, já que trabalhos realizados comprovaram resultados benéficos quando administradas isoladamente.

Atualmente no Brasil existem dois fitoterápicos registrados na categoria de andrógenos simples (BRASIL, 2019), ambos a base de extrato seco de *T. terrestris* (94mg ou 280mg), sob a forma de comprimidos revestidos. Até agora, nenhum fitoterápico classificado como andrógeno misto possui registro ativo, o que estimula e justifica a realização de estudos com associações de *T. terrestris* e *L. meyenii*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão de literatura é possível constatar que o *T. terrestris* e a *L. meyenii* possuem propriedades androgênicas de interesse tanto em Medicina bem como em Medicina Veterinária. Tais propriedades poderiam ser utilizadas para o tratamento de subfertilidade/infertilidade bem como para melhora de performance atlética e ganho de massa corpórea. Portanto, é possível que a associação entre as duas espécies de plantas possa resultar em incrementos satisfatórios em parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais quando comparado à administração de somente uma dessas.

REFERÊNCIAS

- ADAIKAN, P. G.; GAUTHAMAN, K.; PRASAD, R. N. History of herbal medicines with insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*. **The Aging Male**, v. 4, n. 3, p.163–169, 2001.
- ADEWOLE, S. O.; CAXTON-MARTINS, E. A.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 1, p. 64-74, 2006.
- ADIMOELJA, A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. **International Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 82-84, 2000.
- ADIMOELJA, A.; ADAIKAN, P. G. Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L. improves the male sexual functions, probably via DHEA. **International Journal of Impotence Research**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 1997.
- AGGARWAL, A. et al. A novel antilithiatic protein from *Tribulus terrestris* having cytoprotective potency. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, n. 8, p. 812-819, 2012.
- AKRAM, M. et al. *Tribulus terrestris* Linn. A review article. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3601-3605, 2011.
- AL-ALI, M. et al. *Tribulus terrestris*: Preliminary study of its diuretic and contractile effects and comparison with *Zea mays*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 257-260, 2003.
- AL-BAYATI, F. A.; AL-MOLA, H. F. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 2, p. 154-159, 2008.
- ALEXANDRE, R. F.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 1. Medicamentos fitoterápicos elaborados com ginkgo, hipérico, kava e valeriana. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 300-309, 2005.

- ALMUKADI, H. et al. The macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 2, p. 333–339, 2013.
- AL-YAWER, M. et al. Effects of AL-Qutub (*Tribulus terrestris*) on the spermatogenesis of the mouse testis: histological, histochemical and morphometrical Studies. **Journal of the Faculty of Medicine Baghdad**, v. 50, n. 2, p. 246-54, 2008.
- AMIN, A. et al. The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1084, n. 1, p. 391-401, 2006.
- ANAND, R. et al. Activity of certain fractions of *Tribulus terrestris* fruits against experimentally induced urolithiasis in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 32, n. 8, p. 548-552, 1994.
- ANDRADE, A. J. et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): nonmonotonic dose response and low dose effects on rat brain aromatase activity. **Toxicology**, v. 227, n. 3, p. 185-192, 2006.
- ARCASOY, H. B. et al. Effect of *Tribulus terrestris* L. saponin mixture on some smooth muscle preparations: A preliminary study. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 137, n. 11, p. 473-475, 1998.
- ARSYAD, K. M. Effect of protodioscin on the quantity and quality of sperms from males with moderate idiopathic oligozoospermia. **Medika**, v. 22, n. 8, p. 614-618, 1996.
- ASLANI, M. R. et al. Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in goats. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 3, p. 261–267, 2004.
- ASLANI, M. R. et al. Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in sheep: clinical, laboratory and pathological findings. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 1, p. 53–62, 2003.
- BABURAO, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial Activities of methanolic extract of *Tribulus terrestris* Linn plant. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 1867-1872, 2009.
- BASHIR, A. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on testicular development of immature albino rats. **Biomedica**, v. 25, p. 63-68, 2009.
- BELZ, R.G. Stimulation versus inhibition-bioactivity of parthenin, a phytochemical from *Parthenium hysterophorus* L. **Dose Response**, v. 30, n. 1, p. 80-96 , 2007.
- BIANCHI, A. Maca *Lepidium meyenii*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 2, n. 3, p. 30-36, 2003.
- BOURKE, C. A.; STEVENS, G. R.; CARRIGAN, M. J. Locomotor effects in sheep of alkaloids identified in Australian *Tribulus terrestris*. **Australian Veterinary Journal**, v. 69, n. 7, p. 163-165, 1992.
- BRAKO, L.; ZARUCHI, J. (1993). **Catálogos de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú**. Missouri Botanical Garden, St. Louis.

BRASIL. Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?categoriasRegulatorias=4&classeTerapeutica=0502057>>. Acesso em: 29 mar. 2019.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

BUSTOS-OBREGON, E.; YUCRA, S.; GONZALES, G. F. *Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 1, p. 71–76, 2005.

CÁRDENAS, S. E. Recuperación de productos nativos de los Andes: kiwicha y maca. **Revista de Antropología Facultad de Ciencias Sociales. E.A.P. de Antropología**, v. 3, n. 3, p. 193-201, 2005.

CHACÓN DE POPOVICI, G. La Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su habitat. **Revista Peruana de Biología**, v. 3, n. 2, p. 169-272, 1990.

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

CHHATRE, S. et al. Comparative evaluation of diuretic activity of different extracts of *Tribulus terrestris* fruits in experimental animals. **International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology**, v. 3, p. 129-33, 2012.

CHUNG, F. et al. Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 143–147, 2005.

DEEPAK, M. et al. Tribulosin and β -sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 753-756, 2002.

DEL-BAS, J. M. et al. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 479–481, 2005.

DEOLE, Y. S. et al. Evaluation of antidepressant and anxiolytic activity of Rasayana Ghana tablet (a Compound Ayurvedic formulation) in albino mice. **An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda**, v. 32, n. 3, p. 375-379, 2011.

DINCHEV, D. et al. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. **Pytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 176-186, 2008.

DINI, A. et al. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 347-349, 1994.

DONAYRE, J. Effect of high altitude on spermatogenesis. **Excerpta Medica International Congress**, v. 184, p. 1054–1059, 1969.

DOSTERT, N. et al. “Siete especies de plantas vasculares de importancia económica en el Perú: Fichas botánicas”. **Arnaldoa**, v. 20, n. 2, p. 359-432, 2013.

- ELAHI, R. K.; ASL, S.; SHAHIAN, F. Study on the effects of various doses of *Tribulus terrestris* extract on epididymal sperm morphology and count in rat. **Global Veterinaria**, v. 10, n. 1, p. 13-17, 2013.
- EL-SHAIBANY, A. et al. Anti-hyperglycaemic activity of *Tribulus terrestris* L. aerial part extract in glucoseloaded normal rabbits. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 12, p. 2263–2268, 2015.
- FARMACOPÉIA AYUVÉRDICA INDIANA. New Delhi: Govenment of India, Ministry of Health and Family Welfare, 2001, v. 1, p.171.
- GASCO, M.; AGUILAR, J.; GONZALES, G. F. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. **Andrologia**, v. 39, n. 4, p. 151–158, 2007.
- GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G.; PRASAD, R. N. V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. **Life Sciences**, v. 71, n. 12, p. 1385–1396, 2002.
- GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of erectile dysfunction: An evaluation using primates, rabbits and rat. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1-2, p. 44-54, 2008.
- GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A.P.; PRASAD, R.N. Sexual effects of puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (Protodioscin): an evaluation using a rat model. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 2, p. 257-265, 2003.
- GHANBARI, A. et al. *Tribulus terrestris* hydroalcoholic extract administration effects on reproductive parameters and serum level of glucose in diabetic male rats. **International Journal of Morphology**, v. 34, n. 2, p. 796-803, 2016.
- GONZALES, G. F. et al. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 3, n. 3, p. 231-233, 2001a.
- GONZALES, C. et al. Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. **Forschende Komplementarmedizin**, v. 17, n. 3, p. 137–143, 2010.
- GONZALES, C. et al. Effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on prostate zinc levels in rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 362–369, 2012.
- GONZALES, G. F. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a plant from the peruvian highlands. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-10, 2012.
- GONZALES, G. F. Maca: del alimento perdido de los Incas al milagro de los Andes: estudio de seguridad alimentaria nutricional. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 16-17, n. 1, p. 16–36, 2010.
- GONZALES, G. F. et al. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. **Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 1, p. 163–168, 2003a.

- GONZALES, G. F. et al. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). **Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 1, p. 87–95, 2004.
- GONZALES, G. F. et al. *Lepidium meyenii* (Maca): A plant from the highlands of Peru – from tradition to Science. **Forschende Komplementärmedizin**, v. 16, n. 6, p. 373–380, 2009.
- GONZALES, G. F.; GONZALES-CASTAÑEDA, C.; GASCO, M. A mixture of extracts from Peruvian plants (black maca and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. **Toxicological Mechanism and Methods**, v. 23, n. 7, p. 509-518, 2013b.
- GONZALES, G. F. et al. Effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. **Andrologia**, v. 38, n. 5, p. 166–172, 2006.
- GONZALES, G. F. et al. Prevention of high altitude-induced testicular disturbances by previous treatment with cyproheptadine in male rats. **Archives of Andrology**, v. 24, n. 2, p. 201–205, 1990.
- GONZALES, G. F. et al. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 5, n. 4, p. 349-352, 2003b.
- GONZALES, G. F.; VASQUEZ, V. B.; GASCO, M. Transillumination technique as a method for the assessment of spermatogenesis using medicinal plants: the effects of extracts of black maca (*Lepidium meyenii*) and camu camu (*Myrciaria Dubia*) on stages of the spermatogenic cycle in male rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 23, p. 559–565, 2013.
- GONZALES, G.F. et al. *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. **Blackwell Publishing: Asian Journal of Andrology**, v. 3, n. 4, p. 301-303, 2001(b).
- GONZALES-ARIMBORGO, C. et al. Acceptability, safety, and efficacy of oral administration of extracts of black or red maca (*Lepidium meyenii*) in adult human subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 3, p. 49, 2016.
- HAMID, S. et al. Effect of *Tribulus terrestris* on serum luteinizing hormone in Sprague Dawley rats. **Pakistan Journal of Physiology**, v. 13, n. 4, p. 38-40, 2017.
- HASHIM, S. et al. Medicinal properties, phytochemistry and pharmacology of *Tribulus terrestris* L. (*Zygophyllaceae*). **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 1, p. 399-404, 2014.
- HEIDARI, M. R. et al. The analgesic effect of *Tribulus terrestris* extract and comparison of gastric ulcerogenicity of the extract with indomethacine in animal experiments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, n. 1, p. 418-427, 2007.
- HERMANN, M.; HELLER, J. (1997) Maca Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, p. 175–194.
- JO, S. H. et al. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 2, n. 4, p. 52-60, 2009.

- KAVITHA, P. et al. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 47, n. 10, p. 698-706, 2011.
- KHAN, S. et al. Antihyperlipidemic potential of fruits of *Tribulus terrestris* Linn. **International Journal of Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 98-101, 2011.
- KISTANOVA, E. et al. Effect of plant *Tribulus terrestris* extract on reproductive performances of rams. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 21, n. 1-2, p. 55-63, 2005.
- KOKATE, C. K.; PUROHIT, A. P.; GOKHALE, S. B. Pharmacognosy. 13th edn. Pune: Nirali Prakashan Publisher; 2007. p. 370.
- KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 2, p. 111–137, 2005.
- LAMBA, H. S. et al. α -glucosidase and aldose reductase inhibitory activity in vitro and antidiabetic activity in vivo of *Tribulus terrestris*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 270-272, 2011.
- LEE, H. H. et al. Anti-inflammatory effect of tribulusamide D isolated from *Tribulus terrestris* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 4421-4428, 2017.
- LEE, M. S. et al. Maca (*Lepidium meyenii*) for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. **Maturitas**, v. 70, n. 3, p. 227–233, 2011.
- LI, G.; AMMERMAN, U.; QUIROS, C. F. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. **Economic Botany**, v. 55, n. 2, p. 255-262, 2001.
- LI, J. et al. Anti-fatigue activity of polysaccharide fractions from *Lepidium meyenii* Walp. (maca). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1305–1311, 2017.
- LI, M. et al. Hypoglycemic effect of saponin from *Tribulus terrestris*. **Zhong Yao Cai**, v. 25, n. 6, p. 420-422, 2002.
- LOPEZ-FANDO, A. et al. *Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 6, p. 471–474, 2004.
- MARTINO-ANDRADE, A. J. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 165–170, 2010.
- MATOS, F. J. A. Plantas de medicina popular do nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza, UFC, 1999. 80p.
- MEISSNER, H. O. et al. Hormone-Balancing Effect of Pre-Gelatinized Organic Maca (*Lepidium peruvianum* Chacon): (I) Biochemical and Pharmacodynamic Study on Maca using Clinical Laboratory Model on Ovariectomized Rats. **International Journal of Biomedical Science**, v. 2, n. 3, p. 260-272, 2006.

- MELNIKOVOVA, I. et al. Effect of *Lepidium meyenii* Walp. on semen parameters and serum hormone levels in healthy adult men: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, article ID 324369, 6 p., 2015.
- MILASIUS, K. et al. Efficacy of the *Tribulus* food supplement used by athletes. **Acta Medica Lituanica**, v. 17, n. 1–2. p. 65–70, 2010.
- MOHAMMED, M. J. Biological activity of saponins isolated from *Tribulus terrestris* (fruit) on growth of some bacteria. **Tikrit Journal of Pure Science**, v. 13, n. 3, p. 17-20, 2008.
- NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **The Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n. 1-3, p. 319-323, 2005.
- OH, H. K. et al. *Tribulus terrestris* inhibits caries-inducing properties of *Streptococcus* mutans. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 25, p. 6061-6066, 2011.
- OHTA, Y. et al. Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) enhances testicular gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rats. **Andrologia**, v. 49, n. 10, p. 1-3, 2017.
- OHTA, Y. et al. Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) increases serum testosterone concentration and enhances steroidogenic ability of Leydig cells in male rats. **Andrologia**, v. 48, n. 3, p. 347–354, 2016.
- ONALAPO, A.Y.; OLADIPO, B.P.; ONALAPO, O.J. Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. **Andrologia**, v. 50, n. 3, p.1-10, 2017.
- PANDEY, R.; SHANKAR, S. B.; SAINIS, S. K. *Tribulus terrestris*. Fruit extract protects against oxidative stress induced apoptosis. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 8, p. 619-625, 2007.
- PHILLIPS, O. A.; MATHEW, K. T.; ORIOWO, M. A. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 351-355, 2006.
- POKRYWKA, A. et al. Insights into supplements with *Tribulus terrestris* used by athletes. **Journal of Human Kinetics**, v. 41, v. 1, p. 99-105, 2014.
- ROAIAH, M. F. et al. Pilot study on the effect of botanical medicine (*Tribulus Terrestris*) on serum testosterone level and erectile function in aging males with partial androgen deficiency (PADAM). **Journal of Sex and Marital Therapy**, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2015.
- ROGERSON, S. et al. The effect of a *Tribulus terrestris* extract on plasma steroid hormone concentrations and the urinary testosterone/epitestosterone (TE) ratio. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 7, n. 4, p. 50, 2004.
- ROGERSON, S. et al. The effect of five weeks of *Tribulus terrestris* supplementation on muscle strength and body composition during preseason training in elite rugby league players. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 21, n. 2, p. 348–353, 2007.

- RUBIO, J. et al. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1114–1122, 2006.
- SALGADO, R. M. et al. Effect of oral administration of *Tribulus terrestris* extract on semen quality and body fat index of infertile men. **Andrologia**, v. 49, n. 5, p. 1–6, 2016.
- SAMANI, N. S. et al. Efficacy of the hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris* on the serum glucose and lipid profile of women with diabetes mellitus: a double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 21, n. 4, p. 1-7, 2016.
- SAMY, M. N. et al. Pharmacognostical studies on stem of *Tribulus terrestris* L. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 5, p.19-23, 2012.
- SAXENA, D. K. Effect of hypoxia by intermittent altitude exposure on semen characteristics and testicular morphology of male rhesus monkeys. **International Journal of Biometeorology**, v. 38, n. 3, p. 137–140, 1995.
- SELLAMI, M. et al. Herbal medicine for sports: a review. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, p. 1-14, 2018.
- SHARIFI, A. M.; DARABI, R.; AKBARLOO, N. Study of antihypertensive mechanism of *Tribulus terrestris* in 2K1C hypertensive rats: role of tissue ACE activity. **Life Sciences**, v. 73, n. 23, p. 2963-2971, 2003.
- SHISHOVSKA, M.; ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; MEMETI, S. A Simple Method for Determination of Protodioscin in *Tribulus Terrestris* L. and Pharmaceuticals by High-Performance Liquid Chromatography Using Diode-Array Detection. **Journal of Chemical Engineering Research Updates**, v. 2, n. 1, p. 12-21, 2015.
- SINGH, R. Medicinal plants: a review. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n.1-1, p. 50-55, 2015.
- SINGH, S. P. et al. Evaluation of *Tribulus terrestris* Linn (Zygophyllaceae) acetone extract for larvicidal and repellence activity against mosquito vectors. **Journal of Communicable Diseases**, v. 40, n. 4, p. 255–261, 2008.
- SINGH, S.; NAIR, V.; GUPTA, Y. K. Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 1, p. 43-47, 2012.
- SISTO, M. et al. Saponins from *Tribulus terrestris* L. protect human keratinocytes from UVB-induced damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 193-201, 2012.
- SIVAPALAN, S. R. Biological and pharmacological studies of *Tribulus terrestris* Linn- a review. **International Journal of Multidisciplinary Research and Development**, v. 3, n. 1, p. 257-265, 2016.
- STOJANOVSKA, L. et al. Maca reduces blood pressure and depression, in a pilot study in postmenopausal women. **Climacteric**, v. 18, n, 1, p. 69–78, 2015.

- SU, L. et al. H. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Steroids**, v. 74, n. 4-5, p. 399–403, 2009.
- SUGUNAVARMAN, T.; JAGADEESAN, G. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* on experimental liver damage in mice. **International Journal of Modern Research and Reviews**, v. 1, n. 1, p. 20-23, 2013.
- TALAZAS, A. H. et al. *Tribulus terrestris*-induced severe nephrotoxicity in a young healthy male. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 11, p. 3792-3793, 2010.
- TAPIA, A. et al. The Maca (*Lepidium meyenii*) and their effect antistress in an animal model in mice. **Acta Andina**, v. 8, p. 45–56, 2000.
- TELLO, J.; HERMANN, M.; CALDERON, A. La maca (*Lepidium meyenii* Walp.) cultivo alimenticio potencial para las zonas andinas. **Boletin Lima**, v. 14, p. 59-66, 1992.
- TILWARI, A.; SHUKLA, N. P.; DEVI, U. Effect of five medicinal plants used in Indian system of medicines on immune function in Wistar rats. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 73, p. 16637-16645, 2011.
- TUNCER, M. A. et al. Influence of *Tribulus terrestris* extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet. **Acta Histochemica**, v. 111, n. 6, p. 488-500, 2009.
- VALENTOVA, K. et al. Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: in vivo safety assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1006–1013, 2008.
- VALERIO, L.; GONZALES, G. F. Toxicological aspects of South American herbs: *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) and *Lepidium meyenii* (maca). A critical synopsis. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 1, p. 11–35, 2005.
- VECERA, R. et al. The influence of maca (*Lepidium meyenii*) on antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 59–63, 2007.
- WANG, W. et al. Immunomodulatory effects of a polysaccharide purified from *Lepidium meyenii* Walp. on macrophages. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 542–553, 2016.
- WANG, Y. et al. Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 811-817, 1997.
- WELSHONS, W. V. et al. Large effects from small exposures I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 994-1006, 2003.
- YANG, Q. et al. Effects of macamides on endurance capacity and anti-fatigue property in prolonged swimming mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n.5, p. 827–834, 2016.
- YIN, L. et al. Effects of *Tribulus terrestris* saponins on exercise performance in overtraining rats and the underlying mechanisms. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 11, p. 1193–1201, 2016.

ZHAI, F. G. et al. Effects of saponins of *Tribulus terrestris* on PPAR γ and NF- κ B signaling pathways expression in rat brain following cerebral ischemic injury. **Medical Recapitulate**, v. 21, n. 24, p. 4539–4540, 2015.

ZHANG, J. D. et al. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 76-84, 2006a.

ZHANG, S.; LI, H.; YANG, S. J. Tribulosin protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 6, p. 671-678, 2010.

ZHANG, Y. et al. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 274–279, 2006b.

ZHU, W. et al. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Tribulus terrestris*. **Chemistry Central Journal**, v.11, n. 1, p. 1-16, 2017.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO****Uso de extrato de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii* em ratos: parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais**

*Este artigo é uma versão preliminar, elaborado de acordo com as normas do periódico Journal of Ethnopharmacology, ao qual será posteriormente submetido. O conselho editorial do periódico poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da administração oral de extratos de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii* sobre parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais em ratos. Trinta e seis ratos Wistar machos com peso inicial de 210 ± 18 g foram divididos em seis grupos experimentais (n=6). Cada grupo recebeu diariamente, durante 28 dias, diferentes doses dos extratos secos de *T. terrestris* e *L. meyenii* dispersos em água destilada: *T. terrestris* na dose de 100mg/kg; *L. meyenii* na dose de 1g/kg e *T. terrestris* nas doses de 75, 50 e 25 mg/kg combinadas a *L. meyenii* nas doses de 0,25, 0,5 e 0,75g/kg, respectivamente, e água destilada (controle). O *T. terrestris* aumentou ($P < 0,05$) a concentração de testosterona no sangue, independente da dose. O uso das associações aumentou ($P < 0,05$) o diâmetro de ducto e de lúmen epididimário na cauda do epidídimo. Já as combinações de *T. terrestris* nas doses de 75 e 50mg/kg com *L. meyenii* nas doses de 0,25 e 0,5g/kg, respectivamente, aumentaram ($P < 0,05$) a concentração espermática. Não houve diferenças ($P > 0,05$) nas demais características seminais, no peso vivo, no peso relativo de fígado, baço, rins, epidídimos, índice gonadossomático, níveis séricos de ureia, creatinina, alanina transaminase, aspartato transaminase, gama glutamil transferase, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL), triglicérides, glicose, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante. Nenhuma alteração histopatológica foi observada nos grupos estudados. Conclui-se que a associação de *T. terrestris* e *L. meyenii*, em determinadas doses, apresentou efeito positivo sobre níveis séricos de testosterona, concentração espermática e morfologia epididimária, sem evidência de efeitos colaterais nos órgãos avaliados.

Palavras-chave: Machos. Plantas medicinais. Testículos. Testosterona. Espermatozoides.

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é um problema crescente em todo o mundo. Estudos evidenciam queda progressiva da qualidade do sêmen humano ao longo das últimas décadas (Aitken, 2013; Levine et al., 2017). Estima-se que problemas reprodutivos afete um em cada quatro casais, sendo que em 50% dos casos estão relacionados com parâmetros seminais anormais (Jungwirth et al., 2012). Essa anormalidade está relacionada à idade e a fatores ambientais e/ou ocupacionais tais como tabagismo, alcoolismo, uso de drogas ilícitas, hábitos alimentares e obesidade, insônia, estresse psicológico, exposição a altas temperaturas, radiação e ondas eletromagnéticas (Durairajanayagam, 2018).

Para amenizar esse problema, uma variedade de produtos naturais, incluindo extratos brutos ou isolados de plantas, estão sendo estudados (Malviya et al., 2016). Além disso, a demanda por fármacos fitoterápicos vem aumentando dia a dia, já que apresentam melhor tolerabilidade, relativa disponibilidade e menor custo (Kaundal et al., 2016). De maneira geral, os efeitos das plantas medicinais nas funções reprodutivas do homem estão associados a compostos antioxidantes, visto que alguns afetam positivamente a espermatogênese e esteroidogênese (Sheweita et al., 2005; Nantia et al., 2009). Além disso, influência no sistema nervoso central ou periférico tem sido associada à melhora da resposta dos tecidos reprodutivos masculinos a neurotransmissores e hormônios sexuais, principalmente FSH, LH e testosterona (Dutta and Sengupta, 2018), além de outros efeitos metabólicos importantes para a saúde do homem.

O *Tribulus terrestris*, pertencente à família *Zygophyllaceae*, tem sido muito utilizado em formulações de fitoterápicos e suplementos alimentares (Chhatre et al., 2014). A ingestão da planta está relacionada ao aumento dos níveis séricos de hormônios androgênicos como testosterona, dihidrotestosterona e dehidroepiandrosterona (DHEA), estimulando a espermatogênese e melhorando a qualidade espermática (Gauthaman and Ganesan, 2008; Karimi Jashini et al., 2012). Já a *Lepidium meyenii*, popularmente conhecida como maca peruana, também tem sido associada a efeitos benéficos sobre a libido e fertilidade devido à sua rica composição fitoquímica (Beharry and Heinrich, 2018).

Os compostos bioativos presentes nas plantas podem agir sinergicamente, potencializando suas propriedades medicinais, ou então antagonicamente, reduzindo ou neutralizando seus efeitos, inclusive os indesejáveis (Singh, 2015). A combinação de diferentes extratos vegetais possibilita reduzir a dose das plantas individuais, evitando assim efeitos adversos pela ingestão de grandes quantidades de cada um quando administrados unicamente

(Jain, 2011). O uso associado do *T. terrestris* e *L. meyenii* e seus efeitos reprodutivos e metabólicos em ratos não foi demonstrado até o momento. É possível que a combinação dessas plantas possa potencializar os benefícios conferidos por cada uma sem ocorrência de toxicidade. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da administração de extratos de *T. terrestris* e *L. meyenii*, isolados ou associados, e em diferentes doses, sobre parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais em ratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todo procedimento experimental descrito a seguir teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição, protocolo número 008/18, e realizado de acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1 Local, animais e delineamento experimental

O experimento foi realizado no Biotério Central Multiusuário da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, Brasil. Um total de 36 *Rattus norvegicus* machos hígidos da linhagem Wistar, de aproximadamente 60 dias de idade e peso de 220 ± 18 g, provenientes da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora-MG, Brasil, foi utilizado. Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno de 37cm x 25cm x 16cm, com densidade populacional de três ratos por caixa, e submetidos a um período de sete dias de aclimação ao ambiente e à equipe de execução do projeto. A sala foi climatizada a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00/19:00). Ração comercial Nuvilab CR-1 (Quimtia, Colombo, Brasil) e água filtrada foram fornecidos *ad libitum* durante os 28 dias de experimento. Os ratos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em seis tratamentos com seis repetições.

2.2 Caracterização dos extratos

Os extratos secos do fruto de *T. terrestris* (lote 16/1) e de hipocótilo de *L. meyenii* (variedade amarela; lote AUTO9254) foram adquiridos de um estabelecimento comercial (Farmácia Fitoterápica Oficina de Ervas, Ribeirão Preto, Brasil). Laudos fitoquímicos foram apresentados, confirmando a autenticidade e qualidade dos produtos. Tais extratos foram dispersos em água destilada à temperatura ambiente mediante uso de agitador eletromagnético Edulab SH21-2 (Edulab, Itapevi, Brasil) obtendo-se suspensões de *T. terrestris* (50mg/ml) e *L.*

meyenii (250mg/ml). As suspensões foram armazenadas sob refrigeração a 4°C até o fim do período de administração aos animais.

2.3 Procedimento experimental

Após a aclimação, os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais, cada grupo contendo seis animais (duas caixas por tratamento). Os grupos experimentais foram:

Grupo 1 (controle): água destilada;

Grupo 2: *T.terrestris* 100mg/kg;

Grupo 3: *T.terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,25g/kg;

Grupo 4: *T.terrestris* 50mg/kg e *L. meyenii* 0,5g/kg;

Grupo 5: *T.terrestris* 25mg/kg e *L. meyenii* 0,75g/kg;

Grupo 6: *L. meyenii* 1g/kg.

As administrações de água destilada e das suspensões de extratos secos, isolados ou associados, de *T. terrestris* e *L. meyenii* foram realizadas via gavagem, no período da manhã, durante 28 dias. O intervalo de doses foi baseado em estudos prévios (Chung et al., 2005; Martino-Andrade et al., 2010). Os animais foram pesados semanalmente para ajuste do volume a ser administrado (máximo 2mL). Ao fim do período experimental, os animais foram submetidos a jejum de oito horas, anestesiados com 80mg/kg de tiopental sódico (Cristália Ltda, Itapira, Brasil) via intraperitoneal, administrado no quadrante abdominal inferior direito e, em seguida, eutanasiados via exsanguinação por punção cardíaca. Amostras de sangue obtidas foram centrifugadas a 1000 x g em centrífuga Excelsa Baby II 206-R (Fanem, São Paulo, Brasil) por 15 minutos para extração de soro e posteriormente congeladas a -20°C até a realização das análises sanguíneas.

Após a eutanásia os animais foram submetidos à abertura de cavidade abdominal para a coleta de fígado, baço e rins. Os testículos e epidídimos também foram expostos e coletados. Todos os órgãos foram pesados e dissecados de forma que ficassem livres de tecidos adjacentes. Após a remoção dos testículos, o índice gonadossomático (IGS) foi obtido a partir da divisão do peso gonadal pelo peso corporal e multiplicado por 100 (França et al., 2006).

2.4 Análises sanguíneas

Os níveis séricos de glicose, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama glutamil transferase (GGT), creatinina, ureia, colesterol total e frações (HDL, LDL e

VLDL) e triglicérides foram mensurados por meio de testes enzimáticos colorimétricos Bioclin[®] (Quibasa Química Básica Ltda, Santa Branca, Brasil). Testes imunoenzimáticos (ELISA) foram utilizados para mensuração dos níveis séricos de FSH (Rat FSH ELISA kit, Elabscience, Houston, EUA), LH (LH ELISA Kit, Enzo, Nova York, EUA) e testosterona (Testosterone ELISA Kit, Novus Biologicals, Centennial, EUA). Todas as análises foram realizadas em duplicata e de acordo com as recomendações dos fabricantes.

2.5 Análises histomorfométricas e histopatológicas

O testículo direito foi imerso em solução de glutaraldeído 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3 por 48 horas. Durante o processo de fixação, secções ao longo da túnica albugínea foram realizadas com o objetivo de garantir maior penetrabilidade do agente fixador no parênquima testicular. Findado o período de fixação, as amostras foram armazenadas em solução tampão fosfato até a etapa de inclusão. Fragmentos testiculares foram submetidos à desidratação em série crescente de alcoóis e inclusos em resina histológica (Chiarini-Garcia et al., 2011).

O epidídimo esquerdo, fígado, baço e rins foram imersos em formaldeído 10% por 24 horas e depois conservados em álcool etílico 70%. Fragmentos desses órgãos foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e embebidos em parafina histológica (Pesce, 1987; Pannocchia, 2008). Secções de 5µm de espessura foram obtidas em micrótomo Lupetec MRP09 (Lupetec, São Carlos, Brasil) e coradas em hematoxilina-eosina (fígado, baço e rins) e azul de toluidina (testículo e epidídimo) para avaliação via microscopia óptica (Chiarini-Garcia et al., 2011). Para as análises histomorfométricas, imagens digitais foram capturadas por câmera digital SC30 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) acoplada a microscópio trinocular Olympus CX31 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). As imagens obtidas foram analisadas no software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, EUA).

Os cortes testiculares foram examinados para mensuração de proporção percentual e volumétrica dos compartimentos tubular (lúmen, epitélio e túnica própria) e intertubular (células de Leydig, vasos sanguíneos e seio linfático). A contagem de 391 pontos foi realizada a partir da sobreposição de uma gráticula em um total de 15 campos escolhidos ao acaso, totalizando 5865 pontos. O volume (mL) de cada componente testicular avaliado foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor desse último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea (Adaptado de França et al., 2006). Em ratos adultos

considera-se o peso da túnica albugínea como sendo 6,5% do peso bruto do testículo (Russell and França, 1995). Ainda, foram analisadas 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram o contorno mais circular possível para obtenção de diâmetro tubular, diâmetro de lúmen e altura de epitélio. Nos cortes de epidídimos, 20 secções transversais dos ductos epididimários mais circulares possíveis dos segmentos da cabeça e cauda foram analisadas. O diâmetro de ducto, diâmetro de lúmen e altura de epitélio foram mensurados.

As análises histopatológicas foram realizadas pela avaliação de dez campos microscópicos ao acaso em diferentes objetivas. O fígado foi avaliado quanto à alterações em arquitetura, hepatócitos, tríades portais e sinusoides. Os rins foram avaliados quanto à lesão tubular proximal e distal. Para o baço, foi analisada a morfologia geral de polpa vermelha e polpa branca e presença de hiperplasia linfoide (Green et al., 2011).

2.6 Avaliação espermática

Em uma placa de Petri contendo 2ml de meio PBS (*phosphate buffered saline*), uma incisão de 2mm de espessura na cauda do epidídimo direito foi realizada. A suspensão obtida foi homogeneizada realizando-se delicados movimentos circulares e em seguida pipetada para microtubo de plástico. O sobrenadante foi imediatamente analisado quanto à concentração, motilidade, viabilidade e morfologia espermáticas, conforme proposto por Oliveira et al. (2015).

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à presença de outliers (QQ-plot), distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk), homocedasticidade (teste de Cochran) e independência de resíduos (teste de Durbin Watson). No caso de não significância nesses testes, foi utilizada a análise de covariância (ANCOVA), sendo o peso vivo inicial dos animais considerado como co-variável. Para as variáveis que não atenderam às premissas da ANCOVA, foi utilizada a opção de transformação de Johnson. As variáveis que não atingiram a normalidade, mesmo após a transformação dos dados, foram submetidas a análises não paramétricas e as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram feitas utilizando o software Action 3.5 (Estatcamp, São Carlos, Brasil).

3 RESULTADOS

O peso vivo dos animais e o peso relativo das vísceras não foram influenciados ($P>0,05$) pelo uso dos suplementos (Tabela 1). Os níveis de testosterona foram maiores ($P<0,01$) somente nos animais que receberam as suspensões contendo *T. terrestris*, independente da dose (Tabela 2). Não houve efeito ($P>0,05$) da administração das suspensões sobre a glicemia e uremia e sobre os níveis de triglicérides, colesterol, lipoproteínas, creatinina, AST, ALT, GGT, FSH e LH no sangue dos animais.

Maior diâmetro de ducto e lúmen epididimário foi observado ($P<0,01$) na cauda do epidídimo quando *T. terrestris* e *L. meyenii* foram associadas (Tabela 3). Entretanto, o uso de *L. meyenii* reduziu ($P<0,01$) a altura do epitélio nesse segmento. O uso de suspensões contendo *T. terrestris* na doses de 75 e 50mg/kg associado à *L. meyenii* nas doses de 0,25 e 0,5g/kg, respectivamente, aumentaram ($P<0,05$) a concentração espermática, porém, não influenciaram ($P>0,05$) as outras características do sêmen avaliadas e as demais características histológicas dos testículos e cabeça do epidídimo.

Quanto à proporção tecidual dos testículos, maior percentual de epitélio seminífero foi observada ($P<0,01$) nos grupos controle e *T. terrestris* 100mg/kg (Tabela 4). A *L. meyenii* na dose de 1g/kg aumentou ($P<0,01$) o percentual de seio linfático. Maior proporção percentual vasos foram encontradas ($P<0,01$) no grupo controle, *T. terrestris* 100mg/kg e na associação de *T. terrestris* 50mg/kg e *L. meyenii* 0,5g/kg.

As análises histopatológicas de fígado, baço e rins revelaram preservação da arquitetura normal dos órgãos em todos os grupos avaliados, não constatando-se nenhum tipo de lesão.

4 DISCUSSÃO

Embora terapias envolvendo o uso de fitoterápicos tenham se mostrado promissoras, muitos desses ainda não foram testados e seus mecanismos de ação e possíveis efeitos adversos permanecem desconhecidos (Ekor, 2014). *T. terrestris* e *L. meyenii* já são alvo de estudo, entretanto, ainda são escassas publicações que avaliem a associação das duas plantas, mesmo já existindo formulações comerciais disponíveis no mercado. Neste trabalho, o uso combinado de seus extratos secos, em determinadas doses, foi capaz de elevar os níveis séricos de testosterona, concentração espermática e parâmetros histomorfométricos de epidídimo.

O peso corporal, bem como os pesos relativos de vísceras, dos animais suplementados com *T. terrestris* e *L. meyenii* não diferiram em relação ao grupo controle, assim como em ratos

Wistar da mesma idade suplementados com diferentes tipos de extratos de *T. terrestris* na dose de 42mg/kg/dia por 70 dias (Oliveira et al., 2015). No entanto, o consumo de 70mg/kg/dia de *T. terrestris* por 20 dias aumentou o peso corpóreo em ratos albinos jovens (Bashir et al., 2009). O maior ganho de peso em animais tratados com *T. terrestris* pode ocorrer devido ao efeito androgênico da planta, produzindo um estímulo para aumento do apetite e consequente aumento de massa corporal (Gauthaman et al., 2003), fato esse não observado no presente trabalho. O peso de ratos Wistar que receberam dieta padrão constituída de 2% de extrato comercial composto por três variedades de *L. meyenii* (amarela, preta e vermelha) ao longo de 6 semanas também não sofreram alterações (Ohta et al., 2016). Segundo Canales et al. (2000), o cozimento da *L. meyenii* aumenta a biodisponibilidade de seus nutrientes, potencializando o uso de suas proteínas para o crescimento corporal. No presente estudo, a administração de extrato seco da planta diluído em água poderia justificar a ausência de maior peso corpóreo nos animais que receberam a maca peruana, associada ou não ao *T. terrestris*.

Ainda não há um consenso sobre o exato mecanismo de ação do *T. terrestris* sobre a espermatogênese e esteroidogênese, mas acredita-se que ocorra a conversão de um de seus derivados fitoquímicos, a protodioscina, principal saponina presente na planta, em dehidroepiandrosterona (DHEA), precursora da testosterona (Adimoelja, 2000; Kostova and Dinchev, 2005). Tal fato justificaria, no presente estudo, o aumento na concentração sanguínea de testosterona nos ratos que receberam o extrato seco de seus frutos em diferentes doses. A protodioscina também atuaria estimulando a produção da enzima 5- α -redutase, a qual converte testosterona em di-hidrotestosterona (DHT) (Arysad, 1996) e aumentaria a produção endógena de andrógenos ao estimular a liberação de LH pela glândula pituitária (Adaikan et al., 2001). Entretanto, os níveis séricos de LH não foram alterados. Também não foi encontrada diferença nos níveis séricos de FSH, contrastando o estudo no qual ratos Wistar que receberam 40 mg/kg/dia de extrato hidroalcoólico de *T. terrestris* por 56 dias apresentaram maiores concentrações sanguíneas desse hormônio. Tais divergências de resultados podem ser atribuídas aos diferentes teores de compostos fitoquímicos da planta de acordo com a região geográfica de origem, variabilidade individual, tempo de administração e aos diferentes tipos de extratos utilizados em cada estudo (Dinchev et al., 2008; Martino-Andrade et al., 2010).

Os níveis séricos de FSH, LH e testosterona dos animais que receberam apenas o extrato seco de *L. meyenii* não sofreram alterações, assim como já relatado em estudos anteriores (Gonzales et al. 2001; 2003; Melnikovova, 2015). Acredita-se que os fitoconstituintes presentes na *L. meyenii* sejam responsáveis por suas propriedades biológicas, contudo, ainda não está claro quais desses metabólitos exerçam diretamente tais atividades (Chung et al., 2005) bem

como seu mecanismo de ação. A ação da maca peruana parece ser apenas no trato reprodutivo, não alterando os níveis de hormônios androgênicos (Gonzales et al., 2003). Em outro trabalho, ratos que receberam extrato da planta em pó apresentaram maiores níveis testiculares de mRNA do gene *HSD3B1* (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 3 β -HSD) (Ohta et al., 2017). Segundo os autores, o aumento da atividade de 3 β -HSD pode elevar a concentração de androstenediona, um precursor da testosterona, sendo esta a possível razão da capacidade esteroidogênica da planta. Alguns estudos demonstram elevações séricas de LH (Uchiyama et al., 2014) e testosterona (Ohta et al., 2016; Oshima et al., 2003) com o uso de *L. meyenii* em ratos, mas ainda são necessárias pesquisas que elucidem o efeito da planta sobre a produção de tais hormônios.

Em relação aos testículos, a administração de três doses diferentes (11, 42 e 110mg/kg/dia) de *T. terrestris* em ratos Wistar machos por 28 dias também não alterou suas características histológicas (Martino-Andrade et al., 2010). Ratos que receberam 2g/kg de extrato aquoso de *L. meyenii* por 1, 3, 5, 7 ou 12 dias também não apresentaram diferenças em áreas tubular e luminal de túbulos seminíferos (Gonzales et al., 2006). Apesar do grupo controle e dos animais tratados apenas com *T. terrestris* (100mg/kg) apresentarem maior percentual de epitélio seminífero, tal incremento não foi observado em proporção volumétrica (mL). Os resultados demonstram que, apesar de ambas as plantas possuírem atividades androgênicas, estas podem não ter sido capazes de estimular alguns tecidos hormono-responsivos, no caso o parênquima testicular (Figura 1). Estudos voltados para uma possível influência do uso de *T. terrestris* e *L. meyenii* sobre a vascularização e drenagem linfática dos testículos devem ser realizados, de modo que se permita compreender as diferenças observadas em tais parâmetros.

A contagem de espermatozoides está intimamente relacionada à fecundidade do homem, sendo um componente crucial da análise do sêmen. Baixa contagem espermática (oligozoospermia) e má qualidade seminal são responsáveis por cerca de 90% dos casos de infertilidade masculina (Sellandi et al., 2012). Diversos trabalhos já demonstraram efeitos benéficos sobre parâmetros espermáticos no homem e roedores com o uso *in vivo* ou *in vitro* de *T. terrestris* (Khaleghi et al., 2016; Salgado et al., 2016; Sanagoo et al., 2019) ou *L. meyenii* (Chung, et al. 2005; Gonzales et. al, 2006; Gasco, et al., 2007). No presente estudo, suspensões contendo *T. terrestris* e *L. meyenii* também foram capazes de elevar a concentração espermática, porém, sem influenciar as demais características do sêmen avaliadas. Diante desses achados, pode-se inferir que associação das plantas nas referidas doses aumentou a atividade espermatogênica, podendo ser útil no tratamento da oligozoospermia.

O epidídimo é um ducto único, altamente enovelado e andrógeno-dependente, revestido por um epitélio pseudoestratificado complexo constituído por uma grande variedade de células. O número e tipo celular variam entre segmentos do órgão (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda). Cada segmento contribui especificamente para o microambiente luminal fundamental para o amadurecimento dos espermatozoides no momento em que estes alcançam a cauda (Kempinas and Klinefelter, 2014). Sabe-se que os segmentos do epidídimo não respondem de maneira similar à suplementação de andrógenos (Fawcett and Hoffer, 1979). Além disso, em ratos orquiectomizados, foram notadas redução em diâmetro de ducto e aumento de altura de epitélio na cauda epididimária. Tais alterações foram atribuídas à ausência de ação androgênica e à liberação da alta pressão hidrostática normalmente encontrada no lúmen desse segmento, permitindo assim a expansão de células epiteliais para espaço luminal anteriormente pressionadas contra a membrana basal pelo fluido luminal e espermatozoides (Hamzeh and Robaire, 2009). Portanto, as alterações encontradas na cauda do epidídimo (Figura 2) no presente estudo podem ser relacionadas ao aumento sérico de testosterona e/ou maior concentração espermática observada em alguns grupos que receberam *T. terrestris* e *L. meyenii* associadas.

Outras atividades biológicas de interesse do *T. terrestris* e da *L. meyenii* são suas ações hipolipidêmica e hipoglicemiante. Compostos fenólicos encontrados nos frutos do *T. terrestris* seriam capazes de elevar os níveis musculares da enzima lipase lipoproteica, mobilizando triglicérides plasmáticos para a produção de energia no músculo ao invés de seu armazenamento nos adipócitos. Também ocorreria aumento nos níveis séricos de HDL, promovendo assim maior remoção de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (Del-Bas et al., 2005; Khan et al., 2011). Saponinas, alcaloides β -carbolínicos e flavonoides presentes na planta estimulariam a secreção de insulina e maior consumo de glicose pela musculatura esquelética, além de proteção às células β -pancreáticas frente ao estresse oxidativo (Jo et al., 2009; El-Shaibany et al., 2015; Su et al., 2009). Fitocompostos da *L. meyenii* como macainas, macamidas, lepidinas e saponinas estão relacionados às suas propriedades antioxidantes que reduziriam os níveis séricos de glicose e lipídios, entretanto, seus mecanismos de ação ainda não são bem compreendidos (Vecera et al., 2007). No presente trabalho a administração de *T. terrestris* e *L. meyenii* não alterou os níveis séricos de glicose, colesterol total e frações e triglicérides.

Efeitos adversos da suplementação de *T. terrestris* são raros e, na maioria das vezes, insignificantes (Sivapalan et al., 2016). A DL_{50} estabelecida em camundongos é de 19,8g/kg (Al-ali et al., 2003). Não foi observada nenhuma alteração clínica e mortalidade em

camundongos que receberam 2g/kg/dia de extrato metanólico de *T. terrestris* por via oral pelo período de quatorze dias (El-Shaibany et al., 2015). Ratos tratados cronicamente com 1g/kg/dia de *L. meyenii* por 84 dias não apresentaram efeitos colaterais e alterações histopatológicas em fígado (Gasco et al., 2007). A DL₅₀ da planta para a espécie é superior a 15g/kg (Meissner et al., 2006). No presente estudo também não foram evidenciados sinais de toxicidade pela administração isolada ou associada das plantas, visto que as análises histopatológicas de fígado, baço e rins revelaram preservação da arquitetura normal dos órgãos em todos os grupos avaliados, não constatando-se nenhum tipo de lesão. Além disso, as enzimas séricas ALT, AST, GGT, creatinina e ureia encontraram-se dentro da normalidade. Dessa forma, pode-se afirmar que a administração única ou combinada de *T. terrestris* e *L. meyenii*, nas doses utilizadas, são seguras para ratos Wistar.

Em conclusão, a administração de *T. terrestris*, isolado ou associado à *L. meyenii* em diferentes doses, foi capaz de elevar os níveis séricos de testosterona. A associação das plantas, em determinadas doses, aumentou a concentração espermática e alterou medidas histomorfométricas de epidídimo, sem evidência de efeitos colaterais em fígado, baço e rins. Dessa forma, o presente trabalho estimula a realização de novas investigações utilizando a associação de *T. terrestris* e *L. meyenii*, podendo tornar-se mais uma alternativa no tratamento da infertilidade masculina.

Referências

- Adaikan, P.G., Gauthaman, K.; Prasad, R.N. 2001. History of herbal medicines with insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*. *The Aging Male* 4, 163–169.
- Adimoelja, A. 2000. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. *International Journal of Andrology* 23, 82-84.
- Aitken, J.R. Falling sperm counts twenty years on: where are we now? 2013. *Asian Journal of Andrology* 15, 204–207.
- Al-Ali, M.; Wahbi, S.; Twaij, H.; Al-Badr, A. 2003. *Tribulus terrestris*: Preliminary study of its diuretic and contractile effects and comparison with *Zea mays*. *Journal of Ethnopharmacology* 85, 257-260.
- Arsyad, K. M. 1996. Effect of protodioscin on the quantity and quality of sperms from males with moderate idiopathic oligozoospermia. *Medika* 22, 614-618.

- Bashir, A., Tahir, M., Samee, W., Munir, B. 2009. Effects of *Tribulus terrestris* on testicular development of immature albino rats. *Biomedica* 25, 63-68.
- Beharry, S.; Heinrich, M. 2018. Is the hype around the reproductive health claims of maca (*Lepidium meyenii* Walp) justified? *Journal of Ethnopharmacology* 211, 126-170.
- Canales, M., Aguilar, J., Prada, A., Marcelo, A., Huamán, C., Carbajal, L. 2000. Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* (MACA) en ratones albinos y su descendencia. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50, 126-133.
- Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D., Sathaye, S. 2014. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Pharmacognosy Reviews* 8, 45–51.
- Chiarini-Garcia, H., Parreira, G.G.P., Almeida, R.C.L. 2011. Glycol Methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: Testes as a model. *Methods in Molecular Biology* 689, 3-18.
- Chung, F., Rubio, J., Gonzales, C., Gasco, M., Gonzales, G.F. 2005. Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 143–147.
- Del-Bas, J.M., Fernandez-Larrea, J., Blay, M., Ardèvol, A., Salvadó, M.J., Arola, L., Bladé, C. 2005. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *The FASEB Journal* 19, 479–481.
- Dinchev, D., Janda, B., Evstatieva, L., Oleszek, W., Aslani, M.R., Kostova, I. 2008. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry* 69, 176-186.
- Durairajanayagam, D. 2018. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology* 16, 10-20.
- Dutta, S., Sengupta, P. Medicinal herbs in the management of male infertility. 2018. *Journal of Pregnancy and Reproduction* 2, 1-6.
- Ekor, M. 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology* 4, 1-10.

El-Shaibany, A., Al-Habori, M., Al-Tahami, B. 2015. Anti-hyperglycaemic activity of *Tribulus terrestris* L. aerial part extract in glucoseloaded normal rabbits. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 14, 2263–2268.

Fawcett, D.W., Hoffer, A.P. 1979. Failure of exogenous androgen to prevent regression of the initial segments of the rat epididymis after efferent duct ligation or orchidectomy. *Biology of Reproduction* 20, 162–181.

França, L.R., Suescun, M.O., Miranda, J.R., Giovambattista, A., Perello, M., Spinedi, E., Calandra, R.S. 2006. Testis structure and function in a nongenetic hyperadipose rat model at prepubertal and adult ages. *Endocrinology* 147, 1556-1563.

Gasco, M., Aguilar, J., Gonzales, G.F. 2007. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. *Andrologia* 39, 151–158.

Gauthaman, K., Ganesan, A.P. 2008. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of erectile dysfunction: An evaluation using primates, rabbits and rat. *Phytomedicine* 15, 44-54.

Gauthaman, K., Ganesan, A.P., Prasad, R.N. 2003. Sexual effects of puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (Protodioscin): an evaluation using a rat model. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9, 257-265.

Gonzales, C., Rubio, J., Gasco, M., Nieto, J., Yucra, S., Gonzales, G.F. 2006. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 448–454.

Gonzales, G.F., Rubio, J., Chung, A., Gasco, M., Villegas, L. 2003. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats. *Asian Journal of Andrology* 5, 349-352.

Gonzales, G.F., Córdova, A., Gonzales, C., Chung, A., Vega, K., Villena, A. 2001. *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. Blackwell Publishing: *Asian Journal of Andrology* 3, 301-303.

Green, C. O., Wheatley, A. O., Hanchard, B., Gibson, T. N., Mcgrowder, D. A., Dilworth, L. L., Asemota, H. N. 2011. Histopathological alterations in organ structures of

hypercholesterolemic rats fed Ortanique peel polymethoxylated flavones. *Basic and Applied Pathology* 4, 71–77.

Hamzeh, M., Robaire, B. 2009. Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of Andrology* 30, 200-212.

Jain, D., Pancholi, S.S., Patel, R. 2011. Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2, 177–183.

Jo, S.H., Ka, E.H., Lee, H.S., Apostolidis, E., Jang, H.D., Kwon, Y.I. 2009. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 2, 52-60.

Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C. 2012. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *European Urology* 62,324–332.

Karimi Jashni, H., Malekzadeh Shiravani, S., Hoshmand, F. The effect of the *Tribulus terrestris* extract on spermatogenesis in the rat. 2012. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences* 9, 7-11.

Kaundal, A., Rana, R., Devi, M. 2016. Infertility treatment using herbal drugs: a review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 3, 194-201.

Kempinas, W.D.G., Klinefelter, G.R. 2014. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 4, 1-12.

Khaleghi, S., Bakhtiari, M., Asadmobini, A., Esmaeili, F. 2016. *Tribulus terrestris* extract improves human sperm parameters in vitro. *The Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* 22, 1–6.

Khan, S., Kabir, H., Jalees, F., Asif, M., Naquvi, K.J. 2011. Antihyperlipidemic potential of fruits of *Tribulus terrestris* Linn. *International Journal of Biomedical Research* 2, 98-101.

Kostova, I., Dinchev, D. 2005. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. *Phytochemistry Reviews* 4, 111–137.

Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., Swan, S.H. 2017. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update* 23, 646–659.

Malviya, N., Malvia, S., Jain, S., Vyas, S. 2016. A review of the potential of medicinal plants in the management and treatment of male sexual dysfunction. *Andrologia* 48, 880–893.

Martino-Andrade, A.J., Morais, R.N., Rossi, S.C., Vechi, M.F., Golin, M., Lombardi, N.F., Greca, C.S., Dalsenter, P.R. 2010. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 165–170.

Meissner, H. O., Mrozikiewicz, P., Bobkiewicz-Kozłowska, T., Mscisz, A., Kedzia, B., Lowicka, A., Reich-Bilinska, H., Kapczynski, W., Barchia, I. 2006. Hormone-Balancing Effect of Pre-Gelatinized Organic Maca (*Lepidium peruvianum* Chacon): (I) Biochemical and Pharmacodynamic Study on Maca using Clinical Laboratory Model on Ovariectomized Rats. *International Journal of Biomedical Science* 2, 260-272.

Melnikovova, I., Fait, T., Kolarova, M., Fernandez, E.C., Milella, L. 2015. Effect of *Lepidium meyenii* Walp. on semen parameters and serum hormone levels in healthy adult men: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 6p.

Nantia, E.A., Moundipa, P.F., Monsees, T.K., Carreau, S. 2009. Medicinal plants as potential male anti-infertility agents: A review. *Basic and Clinical Andrology* 19, 148–158.

Ohta, Y., Kawate, N., Inaba, T., Morii, H., Takahashi, K., Tamada, H.C.E. 2017. Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) enhances testicular gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rats. *Andrologia* 49, 1-3.

Ohta, Y., Yoshida, K., Kamiya, S., Kawate, N., Takahashi, M., Inaba, T., Hatoya, S., Morii, H., Takahashi, K., Ito, M., Ogawa, H., Tamada, H. 2016. Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) increases serum testosterone concentration and enhances steroidogenic ability of Leydig cells in male rats. *Andrologia* 48, 347–354.

Oliveira, N.N.P.M., Félix, M.A.R., Pereira, T.C.S., Rocha, L.G.P., Miranda, J.R., Zangeronimo, M.G., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Sousa, R.V. 2015. Sperm quality and testicular histomorphometry of wistar rats supplemented with extract and fractions of fruit of *Tribulus terrestris* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58, 891–897.

- Oshima, M., GU, Y., Tsukada, S. 2003. Effects of *Lepidium meyenii* Walp and *Jatropha macrantha* on blood levels of estradiol-17 β , progesterone, testosterone and the rate of embryo implantation in mice. *Journal of Veterinary and Medical Sciences* 65, 1145–1146.
- Pannocchia, M.A., Borella, M.I., Camargo, A. C. M., Gilio, J.M., Silva, C.A. 2008. Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero. *ConScientiae Saúde* 7,227-233.
- Pesce, C.M. 1987. The testicular biopsy in the evaluation of male infertility. *Seminars in Diagnostic Pathology* 4, 264-274.
- Russell, L.D., Franca, L.R. 1995. Building a testis. *Tissue and Cell* 27, 129-147.
- Salgado, R.M., Marques-Silva, M. H., Gonçalves, E., Mathias, A.C., Aguiar, J.G., Wolff, P. 2016. Effect of oral administration of *Tribulus terrestris* extract on semen quality and body fat index of infertile men. *Andrologia* 49, 1–6.
- Sanagoo, S., Oskouei, B.S., Abdollahi, N.S., Salehi-Pourmehr, H., Hazhir, N., Farshbaf-Khalili, A. 2019. Effect of *Tribulus terrestris* L. on sperm parameters in men with idiopathic infertility: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine* 42, 95-103.
- Sellandi, T.M., Thakar, A.B., Baghel, M.S. 2012. Clinical study of *Tribulus terrestris* Linn. in Oligozoospermia: A double blind study. *International Quarterly Journal of Research in Ayurveda* 33, 356–364.
- Sheweita, A.S., Tilmisany, M.A., Al-Sawaf, H. 2005. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Current Drug Metabolism* 6, 495–501.
- Singh, R. 2015. Medicinal plants: A review. *Journal of Plant Sciences* 3, 50-55.
- Sivapalan, S.R. 2016. Biological and pharmacological studies of *Tribulus terrestris* Linn - a review. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development* 3, 257-265.
- Su, L., Chen, G., Feng, S.G., Wang, W., Li, Z.F., Chen, H., Liu, Y.X., Pei, Y.H. 2009. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. *Steroids* 74, 399–403.
- Uchiyama, F., Jikyo, T., Takeda, R., Ogata, M. 2014. *Lepidium meyenii* (Maca) enhances the serum levels of luteinising hormone in female rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151, 897-902.

Vecera, R., Orolin, J., Skottova, N., Kazdova, L., Oliyarnik, O., Ulrichova, J., Simanek, V. 2007. The influence of maca (*Lepidium meyenii*) on antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat. *Plant Foods for Human Nutrition* 62, 59–63.

Tabela 1. Peso vivo e peso relativo de vísceras de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*.

Variável	Controle	<i>Tribulus terrestris</i> (mg/kg)					CV (%)	P =
		100	75	50	25	0		
		<i>Lepidium meyenii</i> (g/kg)						
		0,0	0,25	0,5	0,75	1,0		
Peso vivo (g)	284	287	281	287	270	277	3,32	0,42
<i>Peso relativo</i>								
Testículos (%)**	0,98	0,92	1,02	1,00	0,97	0,95	8,15	0,33
Epidídimo (%)	0,19	0,19	0,18	0,19	0,20	0,20	13,06	0,68
Fígado (%)	3,33	3,42	3,38	3,32	3,31	3,36	8,21	0,99
Baço (%)	0,19	0,20	0,18	0,17	0,20	0,18	10,13	0,16
Rins (%)	0,75	0,74	0,74	0,70	0,69	0,72	7,48	0,52

* Não significativo ao teste F ($P > 0,05$)

** Índice gonadossomático

Tabela 2. Parâmetros sanguíneos de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*.

Variável	Controle	<i>Tribulus terrestris</i> (mg/kg)					CV	P =
		100	75	50	25	0		
		<i>Lepidium meyenii</i> (g/kg)						
		0,0	0,25	0,5	0,75	1,0		
Triglicérides (mg/dl)**	66,93	64,67	71,70	74,22	67,86	63,37	-	0,62
Colesterol total (mg/dl)	129,2	128,7	119,1	115,9	118,0	123,3	8,43	0,17
HDL (mg/dl)	51,13	52,48	53,61	54,31	52,22	50,89	20,16	0,99
LDL (mg/dl)	64,76	63,32	51,20	46,77	52,22	59,74	30,46	0,40
VLDL (mg/dl)	13,39	12,93	14,34	14,84	13,57	12,67	16,66	0,54
Glicose (mg/dl)	155,1	152,5	166,1	155,1	152,6	153,6	9,31	0,59
Ureia (mg/dl)	42,25	40,24	46,15	42,56	44,78	42,50	14,43	0,70
Creatinina (mg/dl)	0,54	0,49	0,50	0,39	0,47	0,44	27,46	0,43
AST (U/ml)	59,51	58,48	62,35	62,84	55,76	67,84	36,75	0,96
ALT (U/ml)	33,38	32,59	39,78	37,65	35,88	41,50	25,6	0,53
GGT (mg/dl)	1,35	1,54	1,64	1,83	1,62	1,74	53,78	0,95
FSH (ng/ml)	4,82	5,45	5,20	5,49	5,90	5,35	22,51	0,82
LH (ng/ml)	0,12	0,15	0,07	0,11	0,09	0,11	47,72	0,30
Testosterona (ng/ml) **	3,61b	11,87a	10,04a	11,44a	14,91a	6,67b	-	<0,01

* Não significativo ao teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$)

** Opção de transformação de Johnson

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na mesma linha diferem pelo teste de Scott-Knott

($P < 0,05$)

Tabela 3. Características reprodutivas de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*.

Variável	Controle	<i>Tribulus terrestris</i> (mg/kg)					CV (%)	P =
		100	75	50	25	0		
		<i>Lepidium meyenii</i> (g/kg)						
		0,0	0,25	0,5	0,75	1,0		
<i>Testículo</i>								
Diâmetro de túbulo (µm)	160,4	166,6	170,7	149,3	161,1	168,9	8,78	0,15
Diâmetro de lúmen (µm)*	54,84	52,68	49,44	47,92	50,39	53,04	-	0,14
Altura de epitélio (µm)	50,79	61,33	71,90	53,52	60,39	63,84	22,8	0,14
<i>Cabeça do epidídimo</i>								
Diâmetro de ducto (µm)	95,1	107,5	98,0	110,8	109,8	115,5	15,6	0,30
Diâmetro de lúmen (µm)*	81,3	93,4	84,2	107,4	95,6	102,7	-	0,19
Altura de epitélio (µm)*	7,63	7,62	7,53	7,33	7,60	6,99	-	0,32
<i>Cauda do epidídimo</i>								
Diâmetro de ducto (µm)*	151,8b	154,9b	165,7a	174,3a	171,0a	155,3b	-	0,01
Diâmetro de lúmen (µm)*	141,7b	145,2b	157,4a	165,6a	163,5a	146,6b	-	<0,01
Altura de epitélio (µm)	5,81a	5,17a	4,63b	4,79b	4,49b	4,43b	11,7	<0,01
<i>Características do sêmen</i>								
Motilidade espermática (%)**	65,0	75,0	68,0	76,6	78,0	75,0	-	0,35
Viabilidade espermática (%)	91,8	91,3	91,6	92,5	92,4	95,0	4,82	0,75
Concentração espermática (x10 ⁶ /ml)*	67,0b	74,3b	87,6a	79,0a	61,6b	71,0b	-	0,04
Alterações morfológicas (%)**	4,00	5,33	5,20	3,83	3,80	5,00	-	0,48

* Opção de transformação de Johnson

** Não significativo ao teste de Kruskal-Wallis (P>0,05)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na mesma linha diferem pelo teste de Scott-Knott (P<0,05)

Tabela 4. Dados de proporção testicular (percentual e volumétrica) de ratos Wistar que receberam diferentes doses, em associação ou não, de *Tribulus terrestris* e *Lepidium meyenii*.

Variável	Controle	<i>Tribulus terrestris</i> (mg/kg)					CV (%)	P =
		100	75	50	25	0		
		<i>Lepidium meyenii</i> (g/kg)						
		0,0	0,25	0,5	0,75	1,0		
Composição (%)								
Compartimento tubular	94,8	94,0	94,2	93,5	94,1	92,6	34,7	0,65
Epitélio	84,5a	82,6a	78,1b	80,1b	81,3b	79,5b	3,76	0,02
Lume*	8,08	9,21	13,84	10,68	10,38	10,86	-	0,16
Túnica Própria	2,19	2,21	2,25	2,74	2,40	2,19	20,1	0,31
Compartimento intertubular	5,2	6,0	5,8	6,5	5,9	7,4	25,4	0,67
Seio linfático*	2,77a	3,69a	3,69a	3,96a	3,68a	5,02b	-	<0,01
Vaso*	0,66a	0,46a	0,31b	0,43a	0,23b	0,29b	-	<0,01
Células de Leydig	1,78	1,84	1,76	2,10	2,01	2,13	19,2	0,40
Composição (mL)								
Compartimento tubular	1,23	1,16	1,26	1,25	0,89	1,14	18,8	0,12
Epitélio*	1,10	1,02	1,05	1,07	1,00	0,98	-	0,66
Lume*	0,10	0,11	0,18	0,14	0,13	0,13	-	0,68
Túnica Própria*	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	-	0,16
Compartimento intertubular	0,07	0,07	0,08	0,09	0,06	0,09	-	0,09
Seio linfático*	0,036a	0,045ab	0,049ab	0,053b	0,045ab	0,061b	-	0,05
Vaso*	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	53,0	0,02
Células de Leydig	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	20,5	0,46

* Opção de transformação de Johnson

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na mesma linha diferem pelo teste de Scott-Knott (P<0,05)

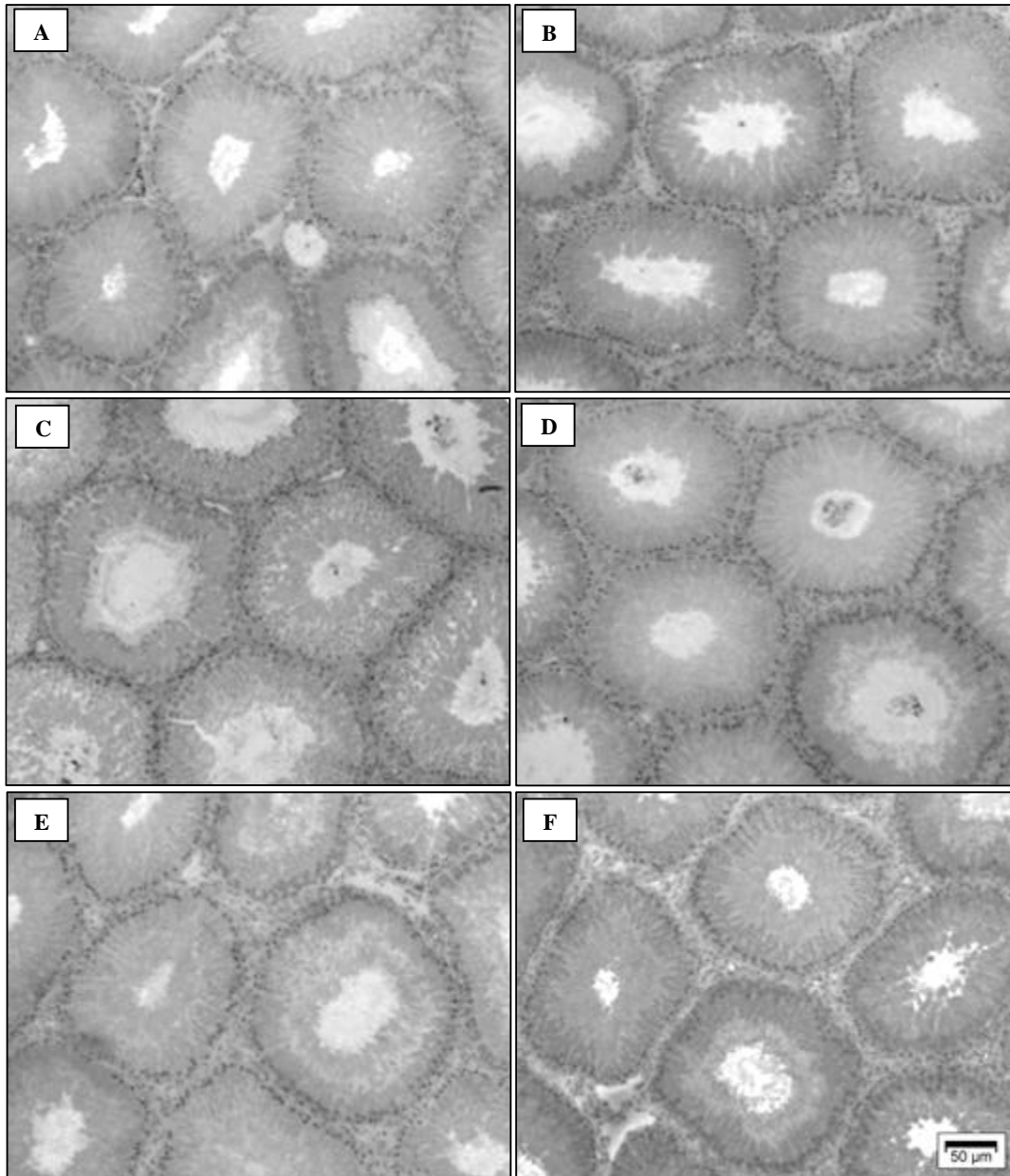


Figura 1: Vista panorâmica do parênquima testicular de ratos Wistar tratados com diferentes doses de *T. terrestris* e *L. meyenii*, em associação ou isoladas. A: controle; B: *T. terrestris* 100mg/kg; C: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,25g/kg; D: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,5g/kg; E: *T. terrestris* 25mg/kg e *L. meyenii* 0,75g/kg; F: *L. meyenii* 1g/kg.

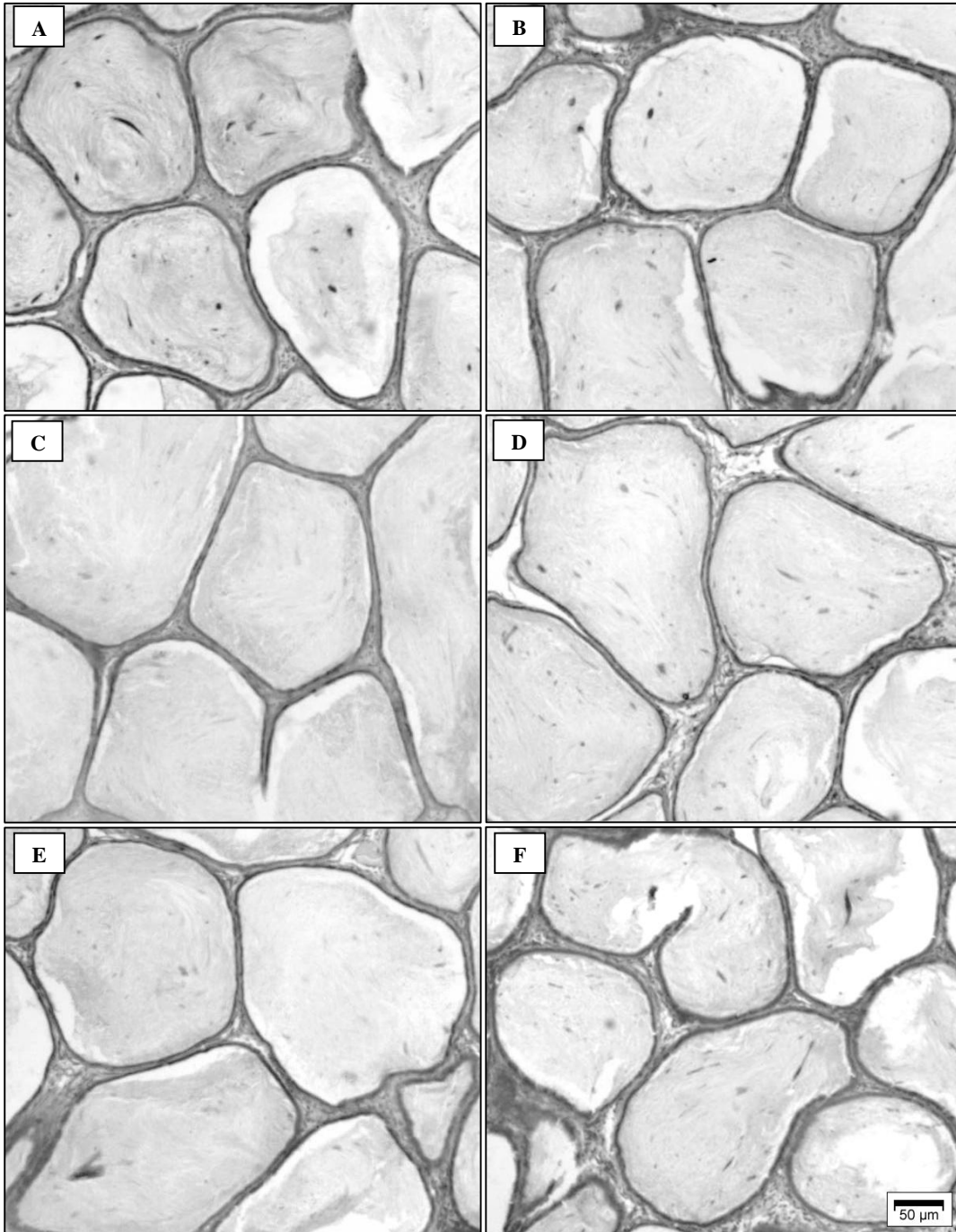


Figura 2: Vista panorâmica do parênquima da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes doses de *T. terrestris* e *L. meyenii*, em associação ou isoladas. Observar maiores diâmetros de ducto e lume epididimário nos grupos C, D e E. A: controle; B: *T. terrestris* 100mg/kg; C: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,25g/kg; D: *T. terrestris* 75mg/kg e *L. meyenii* 0,5g/kg; E: *T. terrestris* 25mg/kg e *L. meyenii* 0,75g/kg; F: *L. meyenii* 1g/kg.

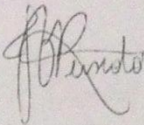
ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da suplementação de *Tribullus terrestris* e *Lepidium meyenii* sobre parâmetros reprodutivos, bioquímicos e corporais em ratos Wistar", protocolo nº 008/18, sob a responsabilidade de Raimundo Vicente de Sousa, José Rafael Miranda, Márcio Gilberto Zangeronimo, Nelma Neylanne Pinho Muniz Oliveira e David Richard Miranda, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 14/03/2018.

Vigência da autorização: de 01/04/2018 a 01/04/2019
Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem/raça: Rato heterogênico / Wistar
Número de animais aprovados: 36
Peso/Idade: 300 g / 60 dias
Sexo: macho
Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): Biotério Central Multiusuário da UFLA - Coordenador Geral do Biotério Central: Prof. Thales Augusto Barçante.



Prof. Juliano Vogas Peixoto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel. +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br