

**NEY FELIPE FERNANDES**

**SUPLEMENTAÇÃO COM *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen E  
PARÂMETROS ANDROGÊNICO-ANABÓLICOS EM RATOS MACHOS EM  
DECLÍNIO REPRODUTIVO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia. Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Nogueira de Moraes  
Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

**CURITIBA**

**2012**

“Conheça todas as teorias. Domine todas as técnicas.  
Mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Gustav Jung

## AGRADECIMENTOS

Acredito piamente que o mérito de um ser consiste em sua contribuição desinteressada para o desenvolvimento de outros seres, estando ele ciente ou não disso. Por isso, gostaria de começar agradecendo aos animais desse estudo. Os ratinhos e muitas outras espécies de animais que doaram e doam as suas vidas para que nós, humanos, possamos caminhar em direção ao progresso. Meus sinceros agradecimentos a vocês, meus irmãozinhos, que Deus os ilumine. Gostaria de deixar aqui o meu sincero “muito obrigado” para a Professora Rosana Nogueira de Moraes por ter me aceitado como seu orientado, por ter tirado paciência não sei de onde para comigo e por me fazer entender a diferença entre ser intelectual e ser inteligente. Com certeza uma das mulheres mais interessantes que já tive oportunidade de conhecer na vida. Agradeço ao Professor Anderson, que na minha opinião faz parte de uma nova geração de professores: mais boa vontade e menos ego. Um dos caras mais bacanas que conheci na vida também. Agradeço a Kethy pelas conversas que tivemos no lab ou na cantina, mostrando que realmente, quem jpa trilhou o caminho pode ser a melhor bússula para quem ainda está atrás de um norte ou simplesmente, atrás de um plano B para seu experimento! Agradeço as meninas do lab (Kathlyn e Camila) por estarem juntas no dia a dia, às vezes apenas perguntando “E aí Ney, como vai seu experimento?”.

Agradeço em especial ao Professor Paulo Dalsenter, por ter cedido seu espaço para a realização do meu experimento, e também todas as meninas do lab que estiveram comigo: Ju Muller (não sei como você era tão paciente comigo!) a Aninha Lourenço (que me ensinou gavagem), a Carol, o Emerson, a Fabi, a Ana, a Samanta, Leone e todas as “IC’s” que, conforme podiam, estavam sempre ajudando. Agradeço ao pessoal do laboratório do Professor Luiz Claudio , em especial ao Gleison que me ensinou a coletar os músculos dos animais, e ao pessoal do Biotério, que faziam da gavagem diária um momento para um bate papo e boas risadas.

Gostaria de agradecer ao Professor Edvaldo Trindade, pois aprendi muito com ele, e a Marlene, sempre com disposição para agilizar as coisas. Agradeço aos grandes amigos que fiz, que também estavam nessa mesma

condição: Danilo e Daniele. Agradeço ao REUNI e a CAPES pela bolsa concedida que foi essencial para me manter enquanto a tive.

Agora, preciso agradecer a base: Muito obrigado, Flavia Fernandes, minha irmã, por ter estado comigo nessa reencarnação “surfando carmas e DNA” e juntos, um ajudando ao outro no processo de lapidação das nossas almas. Agradeço meus amigos do peito: Mauricio (Guido), Mateus, Leonardo e o Chaguinha por estarem comigo e entenderem minha ausência durante esse período. Muito obrigado ao meu primo Su, por simplesmente me ouvir quando eu precisava. Agradeço ao meu Pajé, o André e todas a sua família (Roberta e Maya) que estiveram assistindo de camarote esse processo de “humilhação” que estive passando (você nunca sai do mestrado com a mesma cabeça que entrou!).

Gostaria de deixar um parágrafo especial para a minha companheira, amiga e psicóloga Claudia Rietter. Minha Claudinha. Que, sabe-se lá porque cargas d'água, escolheu ser minha namorada nessa encarnação. Aquela que me ouve, aconselha, me freia e até me provoca para que eu realmente esteja certo do que estou fazendo. Você viu tudo acontecer, meu amor. Você esteve comigo no domingo, me esperando sair do biotério para ir para a praia e ter que voltar no mesmo dia porque, afinal, na manhã seguinte eu já tinha mais gavagem para fazer. Obrigado por estar comigo nessa jornada.

E por último, mas sempre em primeiro lugar, aos meus pais Nei e Margaret. Meu Deus, como deve ser complicado ser um pai e uma mãe. O pai e a mãe que nascem junto com o filho. O pai ou a mãe é aquele que esquece de si mesmo para lembrar do filho. O meu pai, que é o único homem que eu beijo e digo que amo, continua dizendo que sou o homem da vida dele e ele quem me mostrou como é bom ter um bom pai e cabe a mim agora mostrar pra ele como é bom ter um filho. Muito obrigado Maezinha, por ser tão atenciosa, carinhosa, amável e tolerante quando mais precisei. Por sorrir e chorar ao meu lado, e por me fazer conhecer o amor na sua forma mais pura.

Não creio que seja necessário agradecer a Deus, isso seria uma redundância, um pleonismo, pois Ele (ou Ela?) sabe que sua essência está presente em cada palavra acima, em cada ser citado nessas linhas...

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	03
2.1 Testosterona e Andropausa .....	03
2.2 Modelo Experimental de Andropausa .....	08
2.3 Testosterona e Fitoterapia.....	11
2.4 Gênero <i>Pfaffia</i> .....	13
2.5 Ginseng Brasileiro.....	16
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 Objetivo Geral .....	18
3.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1 Extrato seco de <i>Pfaffia glomerata</i> .....	19
4.2 Animais .....	19
4.3 Experimento crônico de curta duração em ratos intactos .....	19
4.3.1 Tratamento .....	20
4.3.2 Avaliação dos efeitos da suplementação com PG .....	21
4.3.2.1 Pesagem de fígado, rins e órgãos sensíveis e andrógenos .....	21
4.3.2.2 Extração e dosagem de androgênicos fecais .....	21
4.3.2.3 Dosagem de testosterona sérica .....	23
4.3.2.4 Contagem de Espermatozóides .....	23
4.3.2.5 Histologia Testicular .....	24
4.3.2.6 Histologia músculo-esquelética .....	25
4.4 Teste de androgenicidade e anti-androgenicidade usando ratos machos castrados – Teste de Hershberger .....	25
4.5 Controle Histórico .....	27
4.6 Análise Estatística .....	29
<b>5 RESULTADOS</b> .....	30
5.1 Avaliação da suplementação com <i>Pfaffia glomerata</i> em ratos intactos .....	30
5.1.1 Análise do peso dos órgãos sensíveis a andrógenos .....	30
5.1.2 Análise de andrógenos fecais .....	31

5.1.3 Análise de testosterona sérica .....	31
5.1.4 Contagem de espermatozoides .....	32
5.1.5 Histologia testicular e músculo-esquelética .....	33
5.1.6 Teste de androgenicidade a anti-androgenicidade usando ratos machos castrados – Teste de Hershberger.....	36
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- FÓRMULA QUÍMICA DA TESTOSTERONA.....	03
FIGURA 2	- EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO.....	04
FIGURA 3	- ESTRUTURA QUÍMICA DA BETA-ECDISTERONA.....	15
FIGURA 4	- GAVAGEM.....	20
FIGURA 5	- COLETA DO MÚSCULO LEVANTADOR DO ÂNUS.....	21
FIGURA 6	- CURVAS DO LOGARÍTMO DA CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA EM RELAÇÃO AO PERCENTUAL DE LIGAÇÃO DO HORMÔNIO CONJUGADO COM HRP .....	24
FIGURA 7	- MÉDIA DIÁRIA ( $\pm$ EPM) DAS CONCENTRAÇÕES DE ANDROGÊNIOS FECAIS NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> E GRUPO CONTROLE.....	31
FIGURA 8	- CONCENTRAÇÕES MÉDIAS ( $\pm$ EPM) DE TESTOSTERONA SÉRICA ENTRE OS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> E GRUPO CONTROLE.....	32
FIGURA 9	- MÉDIA DIÁRIA ( $\pm$ EPM) DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMÁTIDES POR TESTÍCULO NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> E GRUPO CONTROLE.....	33
FIGURA 10	- EXEMPLO DE SECÇÃO TRANSVERSAL DE TESTÍCULOS DE UM ANIMAL DO GRUPO 1 ( <i>Pfaffia glomerata</i> : 8,5 mg/Kg)EM AUMENTO DE 100 X .....	34
FIGURA 11	- EXEMPLO DE SECÇÃO TRANSVERSAL DE FIBRAS MUSCULARES DE UM ANIMAL DO GRUPO 2 ( <i>Pfaffia glomerata</i> : 35 mg/Kg)EM AUMENTO DE 100 X .....	34
FIGURA 12	- MÉDIA ( $\pm$ EPM) DO DIÂMETRO DOS TUBULOS SEMINIFEROS NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> E GRUPO CONTROLE.....	35
FIGURA 13	- MÉDIA ( $\pm$ EPM) DA AREA DE SECÇÃO TRANSVERSAL DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELETICAS DO MUSCULO SOLEO DIREITO DOS ANIMAIS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> E GRUPO CONTROLE .....	35
FIGURA 14	- MÉDIA ( $\pm$ EPM) DO PESO RELATIVO DO FIGADO NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T) E TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E <i>Pfaffia glomerata</i> (T + PG) .....	36
FIGURA 15	- MÉDIA ( $\pm$ EPM) DO PESO RELATIVO DOS RINS NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T) E TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E <i>Pfaffia glomerata</i> (T + PG).....	37
FIGURA 16	- MÉDIA ( $\pm$ EPM) DO PESO RELATIVO DO MUSCULO LEVANTADOR DO ANUS (LABC) NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T) E TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E <i>Pfaffia glomerata</i> (T + PG).....	37
FIGURA 17	- MÉDIA ( $\pm$ EPM) DO PESO RELATIVO DA VESICULA SEMINAL NOS GRUPOS	

	TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T) E TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E <i>Pfaffia glomerata</i> (T + PG).....	38
FIGURA 18 -	MÉDIA ( $\pm$ EPM) DO PESO RELATIVO DA GLANDE NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T) E TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E <i>Pfaffia glomerata</i> (T + PG).....	39
FIGURA 19 -	MÉDIA ( $\pm$ EPM) DO PESO RELATIVO DA PRÓSTATA NOS GRUPOS TRATADOS COM <i>Pfaffia glomerata</i> (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T) E TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E <i>Pfaffia glomerata</i> (T + PG).....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>1</b>	MÉDIA ( $\pm$ EPM) DOS PESOS RELATIVOS (g%) DOS ÓRGÃOS PESADOS			
-		IMEDIATAMENTE	APÓS	O	30
		SACRIFÍCIO.....			
<b>TABELA</b>	<b>2</b>	MÉDIA (( $\pm$ EPM) DOS PESOS ABSOLUTOS (g) DOS ÓRGÃOS PESADOS			
-		IMEDIATAMENTE	APÓS	O	41
		SACRIFÍCIO.....			

## RESUMO

A utilização de plantas medicinais visando atenuar o comprometimento da androgênese masculina faz parte da medicina tradicional e pode substituir as terapias com hormônios sintéticos. A literatura já dispõe de estudos, tanto em modelo animal quanto humanos, demonstrando que determinadas drogas vegetais podem elevar os níveis de testosterona. O presente estudo avaliou os efeitos (anti) androgênicos e anabólicos da suplementação com o extrato de *Pfaffia glomerata* em ratos machos intactos e castrados. No experimento crônico, os animais intactos com oito meses de idade receberam três doses diferentes do extrato seco da planta: 8,5mg/kg, 30mg/kg e 85 mg/kg – além do grupo controle tratado com veículo (água destilada). Ao final do experimento foram avaliados parâmetros específicos do sistema reprodutivo masculino: peso de órgãos sexuais, androgênios fecais, testosterona plasmática, produção espermática diária e histologia testicular. Para identificar um possível efeito anabólico foi realizada histologia músculo-esquelética. Adicionalmente, foi realizado o teste de Hershberger com animais de 90 dias, visando identificar uma resposta (anti) androgênica direta do extrato. Ao final do experimento, não foram observadas diferenças significativas nos pesos dos órgãos andrógeno-dependentes (próstata, vesícula seminal, epidídimos, testículos, rins, fígado e músculo levantador do ânus), os níveis de androgênios fecais e séricos não diferiram significativamente entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Após a análise de 20 túbulos e 100 fibras musculares por animal, tanto a histologia testicular quanto a músculo-esquelética não revelaram diferenças no diâmetro dos túbulos seminíferos entre os grupos ( $P = 0,96$ ) e na área total das fibras musculares do músculo sóleo de pata direita dos animais ( $P = 0,44$ ). Os resultados do teste de Hershberger indicam que a suplementação com o extrato de *Pfaffia glomerata* não possui efeito androgênico ou anti-androgênico no teste de Hershberger com animais *in vivo*. Desta forma, esses achados demonstram que o extrato de *Pfaffia glomerata* não apresenta efeitos estimulantes androgênicos e/ou anabólico muscular, nem tem ações androgênicas e/ou anti-androgênicas diretas.

## ABSTRACT

The use of medicinal plants aiming to soften the masculine androgenesis has been part of the traditional medicine and it can replace synthetic hormone therapies. There are already studies in literature, both about animal models and human, depicting that particular vegetable drugs are able to increase the testosterone levels. This study evaluated the (anti) androgenic and anabolic effects of *Pfaffia glomerata* extract supplementation in male castrated mice. In the chronic test, eight-months-old intact animals received three different doses of the plant's dry extract: 8,5mg/kg, 30mg/kg and 85 mg/kg – also the control group was treated with vehicle (distilled water). At the end of the experiment specific male reproductive system parameters were evaluated: sexual organs weight, fecal androgens, plasma testosterone, daily sperm production and testicular histology. A muscle-skeletal histology was performed in order to identify a possible anabolic effect. In addition to that, the Hershberger test was performed in 90-day-old animals, in order to identify an (anti) androgenic response directly from the extract. By the end of the experiment, significant differences were not perceived in the androgen-dependent organs (prostate, seminal vesicle, epididymis, testicles, kidneys, liver and labc), the fecal and serum androgens haven't differed significantly among the groups ( $P > 0,05$ ). After analyzing 20 tubules and 100 muscle fibers in each animal, both testicle histology and muscle-skeletal haven't revealed differences regarding the tubules diameter among the groups ( $P = 0,96$ ) and the total area of the muscle fibers of the soleus muscle from the animal's right paw ( $P = 0,44$ ). The Hershberger tests results with *in-vivo* animals indicate that the dry extract of *Pfaffia glomerata* supplementation doesn't have any anti-androgenic or androgenic effect. Therefore, this results show that the *Pfaffia glomerata*'s dry extract does not present neither androgenic stimulating effects nor muscle anabolic, neither has androgenic action nor direct anti-androgenic action.

## 1. INTRODUÇÃO

A andropausa, também conhecida como hipogonadismo tardio, caracteriza-se pelos níveis reduzidos de androgênios em homens após uma determinada idade. Sabe-se hoje que aproximadamente 20% dos homens aos sessenta anos de idade, e 50% dos homens aos oitenta anos, evidenciam algum tipo de deficiência na síntese de testosterona (BRAWER, 2004), apresentando níveis basais desse hormônio reduzidos à metade da concentração dos níveis da fase adulta (RHOADES e TANNER, 1995). Os sintomas da andropausa incluem: perda de massa muscular, perda de força, desmineralização óssea, alteração do humor, maior suscetibilidade a diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, aumento de gordura visceral, diminuição da produção espermática, diminuição da taxa metabólica basal, redução da libido e disfunção erétil (ANDRADE JUNIOR, CLAPAUCH e BUKSMAN, 2009; BREMNER, VITIELO e PRINZ, 1983).

Tais sintomas decorrem da redução das concentrações plasmáticas de testosterona, já que é um hormônio esteróide com ação anabolizante (manutenção e desenvolvimento da massa muscular-esquelética, massa óssea, eritropoiese, retenção de nitrogênio) e ação virilizante. A testosterona é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais primárias e secundárias, incluindo crescimento e manutenção dos órgãos sexuais acessórios, crescimento de pelos faciais, axilares e pubianos, aumento da espessura das cordas vocais, manutenção da libido e da espermatogênese (BRAWER, 2004; HIRSHFIELD e FLAWS, 2006).

Com o objetivo de reverter e/ou minimizar esse quadro em homens na andropausa, a terapia de reposição hormonal sintética tem se mostrado eficaz para tratar a perda óssea e muscular bem como as alterações de humor, queda de libido e disfunção erétil (MYERS e MEACHAM, 2003). Porém, a administração de testosterona exógena, mesmo visando uma melhora na qualidade de vida do indivíduo, pode trazer efeitos colaterais indesejáveis como atrofia testicular, azoospermia ou oligospermia (MYERS e MEACHAM, 2003; SWERDLOFF *et al.*, 1998), aumento da probabilidade de tumores de próstata, alterações no perfil lipídico sérico (HERBST *et al.*, 2003), insônia, retenção

hídrica e de sal, arritmia cardíaca, hipertensão arterial e insuficiência renal (MARTITS, COSTA, 2005; LIU *et al.*, 2003).

Devido aos possíveis efeitos colaterais da terapia com hormônios sintéticos, uma classe de medicamentos parece ser útil para tratar deste problema: os fitoterápicos ou drogas vegetais. No Oriente, a utilização de plantas medicinais na prevenção ou tratamento de doenças constitui uma prática milenar. A obra chinesa Pen Ts'ao (*A Grande Fitoterapia*) de Shen Nung (2.800 a.C.) é uma das primeiras referências sobre a utilização medicinal de plantas. No ocidente, os primeiros registros sobre fitoterapia são do século V a.C. e foram feitos por Dioscórides em sua obra "De Matéria Médica", na qual catalogou mais de 600 plantas disponíveis para uso medicinal (TOMAZZONI *et al.*, 2006).

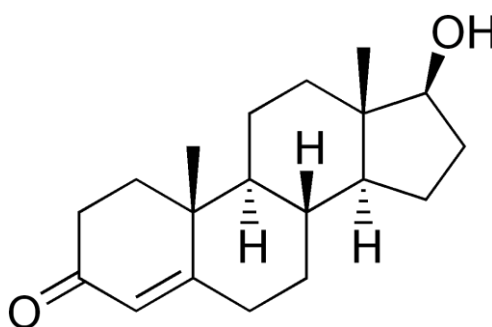
Estudos incluindo plantas como *Tribulus terrestris* (Brown *et al.*, 2001) , *Basella alba* (Moundipa *et al.*, 2005) e *Panax ginseng* (Fahim *et al.*, 1982) já demonstraram alterar o perfil hormonal androgênico tanto em animais experimentais quanto em humanos (EL-TANTAWY, TEMRAZ e EL-GINDI, 2007; FAHIM *et al.*, 1982; MOUNDIPA *et al.*, 2005). Este último, o *Panax ginseng*, também conhecido apenas como ginseng coreano, pode ser confundido com uma planta brasileira, conhecida popularmente como ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). Sua semelhança, no entanto, restringe-se à morfologia da raiz da planta, a qual lembra o formato de um corpo humano, sendo que suas propriedades e ações terapêuticas diferem grandemente (VIGO *et al.*, 2004; PINELLO *et al.*, 2006; GOSMANN *et al.*, 2003). Por exemplo, o ginseng coreano tem um comprovado efeito como tônico reprodutivo, enquanto para o ginseng brasileiro, ainda que alguns efeitos terapêuticos positivos do ginseng brasileiro já tenham sido evidenciados (PINELLO *et al.*, 2006; SILVA, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2007), não existem dados disponíveis sobre o impacto da suplementação deste fitoterápico sobre os perfis androgênicos. A semelhança dos nomes, entretanto, poderia induzir a uma crença de que o ginseng brasileiro poderia também ser utilizado como um tônico reprodutivo. Sendo assim, o propósito do presente estudo foi avaliar um possível efeito androgênico e/ou anabólico ou, ainda, anti-androgênico da suplementação de *Pfaffia glomerata* em ratos machos em fase de declínio reprodutivo intactos e em ratos de pré-puberes castrados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Testosterona e Andropausa

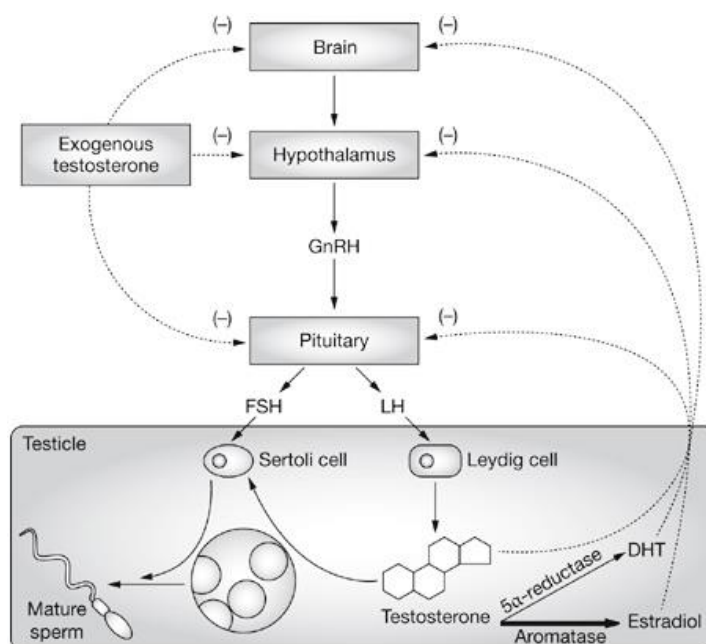
A testosterona é um hormônio esteróide e, como tal, tem em sua estrutura três anéis de seis carbonos unidos a um anel de cinco carbonos (Figura 1), sendo sua molécula precursora o colesterol (NELSON e COX, 2006). O estímulo para produção de testosterona pelo testículo tem seu início no hipotálamo, quando o *hormônio liberador da gonadotrofina* (GnRH), liberado de maneira pulsátil a cada 90 a 120 minutos, estimula a hipófise anterior a secretar o *hormônio luteinizante* (LH) (GRIFFIN *et al.*, 2010) (Figura 2). O LH uma vez liberado na corrente sanguínea, irá estimular a síntese e a secreção de testosterona pelas células de Leydig, que são células especializadas originadas a partir de fibroblastos, localizadas no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos (BAKER e O'SHAUGHNESSY, 2001; COUTO *et al.*, 2010) e compõem cerca de 3% do peso total de cada testículo (FREYBERGER e SHLADT, 2009)

FIGURA 1 – FÓRMULA QUÍMICA DA TESTOSTERONA



FONTE: NELSON e COX (2006)

FIGURA 2-EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO



FONTE: ROTH *et al.* (2008)

Após sua difusão para os capilares sanguíneos, a testosterona se fixa a proteínas séricas transportadoras, de modo que 60% da testosterona circulante está ligada à globulinas fixadoras de hormônios sexuais (SHGB), 38% ligada à albumina e apenas 2% permanecem como hormônio “livre”. Uma vez circulante, a testosterona pode assumir dois destinos: difundir-se para os seus tecidos-alvos, e aí exercer suas ações e ser metabolizada a outras formas ativas ou inativas, ou ser convertida em metabólitos inativos por enzimas hepáticas (KAUFMAN e VERMEULEN, 2005).

Nos tecidos-alvo, a testosterona, devido a sua estrutura hidrofóbica, difunde-se pela membrana plasmática, podendo atuar diretamente nos receptores androgênicos (músculo esquelético, tecido adiposo, etc.), ou ser convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5- $\alpha$ -redutase, fazendo com que a ação androgênica nestas células seja até dez vezes maior que a da testosterona (WINDAHL *et al.*, 2011). A testosterona e o DHT partilham do mesmo receptor, que se encontra no citoplasma associado a proteínas chaperonas. Uma vez formado o complexo receptor-ligante, essas proteínas se dissociam e o complexo transloca-se para o núcleo estimulando a síntese de proteínas através de um aumento no processo de transcrição de RNA. A

testosterona, principalmente no tecido nervoso, pode ainda atuar na forma de estradiol, após sua conversão neural por meio da enzima aromatase. (SON *et al.*, 2010).

As ações androgênicas da testosterona envolvem dois aspectos diferentes: ação anabolizante (manutenção e desenvolvimento da massa muscular-esquelética, massa óssea, eritropoiese, retenção de nitrogênio) e ação androgênica, caracterizada pela diferenciação sexual e desenvolvimento das características sexuais primárias e características sexuais secundárias, incluindo crescimento e manutenção dos órgãos sexuais acessórios, crescimento de pelos faciais, axilares e pubianos, aumento da espessura das cordas vocais, manutenção da libido e da espermatogênese. A testosterona também desempenha um importante papel no metabolismo glicídico e lipídico (KATH, KATH e MCARDLE, 2008).

A testosterona estimula a síntese de proteínas diretamente através de sua ligação com receptores nucleares e indiretamente, ampliando a liberação do hormônio do crescimento (GH) promovendo também a síntese de outro modulador anabólico, a somatostatina ou fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) pelo fígado. No músculo esquelético, a testosterona estimula a captação de nitrogênio além de potássio, magnésio, fósforo, sódio e enxofre, sendo também responsável pelo aumento da taxa metabólica basal. A testosterona exerce ainda importante papel na mineralização óssea, visto que a mesma aumenta a quantidade total da matriz óssea, causando maior retenção de cálcio (SATTLER *et al.*, 2009, GINZBURG *et al.*, 2010).

Na medida em que a idade do indivíduo avança, a produção, bem como a biodisponibilidade deste hormônio torna-se reduzida (HARMAN *et al.*, 2000). Comumente, após os 30 anos de idade, os níveis de testosterona declinam aproximadamente 1% ao ano (BRAUER, 2004) de forma que, se um homem adulto produz em média 6 a 7 mg de testosterona diários, após os 50 anos esse número reduz quase pela metade, chegando a 4 mg/dia (RHOADES e TANNER, 1995).

O hipogonadismo masculino tardio, conhecido também como andropausa, se caracteriza pelos níveis reduzidos deste hormônio androgênico, e seus sintomas são: perda de massa muscular, perda de força, desmineralização óssea, alteração do humor, maior suscetibilidade a diabetes

*mellitus* tipo 2, dislipidemia, aumento de gordura visceral, diminuição da produção espermática, diminuição da taxa metabólica basal, redução da libido e disfunção erétil (ANDRADE JUNIOR, CLAPAUCH e BUKSMAN, 2009; BREMNER, VITIELO e PRINZ, 1983). Atualmente sabe-se que a disfunção erétil não é consequência apenas dos níveis reduzidos de testosterona (Zhang *et al.*, 2010), e acomete aproximadamente 650 milhões de homens com idade superior a 60 anos em todo o mundo, sendo que apenas aproximadamente 20% da população acima dos 60 anos apresentam andropausa (MARTITS e COSTA, 2005; BRAWER, 2004). Em animais experimentais também é possível identificar mudanças importantes da função reprodutiva com o avançar da idade, de modo similar às características apresentadas por homens em andropausa, servindo inclusive de modelo experimental para estudar esse processo do envelhecimento masculino (RUSS *et al.*, 2011).

Com o reconhecimento da importância dos níveis de testosterona na qualidade de vida de homens na fase senil, a administração de testosterona sintética tem sido usada em terapias de andropausa. O objetivo é não apenas a recuperação do desempenho sexual, mas também contrabalancear os efeitos deletérios dos baixos níveis deste hormônio, como a redução de tecido muscular e ósseo, descalcificação óssea, alterações na autoestima e no humor, em geral, e perda de tecido muscular que é consequência de idade avançada (PAGE *et al.*, 2005).

Junior, Clapauch e Buksman (2009) avaliaram a eficácia, bem como a segurança do tratamento com reposição de testosterona através da administração exógena em 62 indivíduos hipogonádicos acima de 50 anos, os quais foram divididos em três grupos: hipogonádicos com administração de testosterona (HR), hipogonádicos (HV) e não hipogonádicos (CV). A administração de cipionato de testosterona intramuscular (200mg a cada três semanas durante seis meses). Após a oitava semana o grupo HR apresentou melhora na libido, diminuição da circunferência da cintura, sem alterações prostáticas ou hematológicas.

A testosterona ainda se mostra partícipe de outros processos regulatórios corporais que vão além da manutenção tecidual (óssea ou muscular). De acordo com Saad (2009), há uma interligação entre síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e disfunção erétil em indivíduos

hipogonádicos, sendo que homens diabéticos apresentam níveis de testosterona mais baixos que homens não diabéticos. Além disso, níveis de testosterona reduzidos podem favorecer um ambiente metabólico propício para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 e síndrome metabólica.

A administração exógena de testosterona tem se mostrado como uma alternativa viável para a reversão do quadro de perda óssea e muscular dentre outros fatores supracitados. Indivíduos que recebem administração exógena deste hormônio relatam melhora de humor, restauração da libido, melhora de bem-estar, diminuição da perda de massa muscular e aumento da densidade mineral óssea (MYERS e MEACHAM, 2003). Indivíduos hipogonádicos apresentam maior densidade óssea na coluna lombar e quadril após reposição hormonal (MARTINS e COSTA, 2005). No entanto, a terapia de reposição sintética pode envolver alguns riscos que se pronunciam de maneira variada nos pacientes, seja a curto, médio ou longo prazo.

Quando a administração exógena de testosterona é realizada em doses supra-fisiológicas e crônicas, os efeitos colaterais podem ser mais pronunciados, como aqueles já bem conhecidos e documentados por autoridades desportivas. Muitos deles são decorrentes do abuso de esteróides pelos praticantes de atividade física visando melhorar o desempenho e/ou estética. Tais doses, já bem elucidadas pelos veículos responsáveis pelo combate do *doping* no meio esportivo, podem pronunciar efeitos como: diminuição da função testicular (com redução concomitante da espermatogênese), ginecomastia – desenvolvimento de mamas, disfunção hepática, carcinoma hepático, cirrose, hepatite, alterações comportamentais e de humor, efeitos deletérios sobre a massa da parede ventricular, lipídeos sanguíneos e tolerância a glicose, constituindo assim um fator agravante para o risco de cardiopatias (POWERS e HOWLEY, 2005; BOMPA e CORNACCHIA, 2000).

Porém, a administração de testosterona exógena em idosos, mesmo dentro de níveis considerados fisiológicos, também pode apresentar alguns efeitos indesejáveis, como a atrofia testicular, via de regra por efeito de retroalimentação negativa do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, além de azoospermia ou oligospermia, como resultado de comprometimento da espermatogênese (MYERS e MEACHAM, 2003; SWERDLOFF *et al.*, 1998).

Outro efeito colateral do uso de testosterona exógena é o aumento da probabilidade de tumores de próstata. Martino-Andrade *et al.* (2010) demonstraram em seu estudo, ratos que recebem administração exógena de testosterona sintética, possuem ao final do experimento a próstata com maior peso absoluto e relativo que os animais do grupo controle. A testosterona, em si, não é a causa do crescimento de células tumorais na próstata, porém é indispensável para tal. O bloqueio da ação da testosterona, suprimindo a secreção de LH (mediante uso de estrogênios) ou por meio de antagonistas de receptores de LH, tem sido usado como terapia para combater o desenvolvimento de um quadro evolutivo deste tipo de câncer (GOMELLA, 2009).

Conforme demonstra Herbst *et al.* (2003), alterações do perfil lipídico sérico, também podem ser observadas em usuários de esteróides sintéticos. Os esteróides influenciam a ação da enzima lipase hepática (HL), diminuindo as concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) circulantes bem como aumentando os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que expõe o usuário a um maior risco de doenças cardiovasculares.

A administração de testosterona sintética, mesmo em doses fisiológicas, pode ainda levar ao aparecimento dos seguintes sintomas: ginecomastia (devido à conversão da testosterona em estrógeno pela enzima aromatase), insônia, retenção hídrica e de sal, o que pode agravar quadros de arritmia cardíaca, hipertensão arterial e insuficiência renal (MARTITS e COSTA, 2005; LIU *et al.*, 2003).

## 2.2. Modelo Experimental de Andropausa

A utilização de ratos como modelo experimental em estudos envolvendo o comportamento e desenvolvimento sexual se iniciou a partir do século XX (1922) com Long e Evans descrevendo a fisiologia do sistema reprodutivo feminino (HIRSHFIELD e FLAWS, 2006). Estudar o sistema reprodutivo de ratos para entender e avaliar o sistema reprodutivo humano pode também nos auxiliar a compreender os processos de envelhecimento e as consequências da idade na função reprodutiva. Entretanto, ainda que muito utilizados como modelos experimentais, estabelecer com exatidão as fases da vida, ou seja, o

limite entre a adolescência e a fase adulta, a fase adulta e a fase senil de ratos ainda é algo não consensual na literatura (AVITAL *et al.*, 2011).

Em estudos que envolvem a maturação neurológica e comportamental do animal, Spear (2000) considera que a fase da adolescência (o final da infância do animal) ocorre entre os dias 28 a 42 após o nascimento ou pós-natal (PN), no entanto Laviola *et al.* (2003) considera que entre os dias 21 a 60 PN o animal ainda se encontra na adolescência. Segundo Bolanos *et al.* (2003) e Kim *et al.* (2011), a adolescência do rato só finda completamente quando o animal atinge a maturidade sexual aos 90 dias PN. O término da fase adulta, bem como o início da velhice ocorre, segundo Cavassani *et al.* (2011) e Poel *et al.* (2011) a partir do vigésimo quarto mês, idade que, segundo Horner, Russ e Biknevicius (2011), seria equivalente à idade de aproximadamente 55 a 60 anos de um homem. Em seu experimento, Kim *et al.* (2011) consideram que ratos com 29 meses de vida são idosos e apresentam comprometimentos vasculares similares a idosos humanos. Segundo Poel *et al.* (2011), ratos com 12 meses de idade são adultos e para Xin *et al.* (2011) animais com 14 meses de idade não estão mais na fase adulta e sim no início da velhice.

Quando se avalia a função reprodutiva, Hirshfield e Flaws (2006), afirmam que a partir de 6 meses, ratos e roedores, em geral, já possuem sinais de desordens no sistema endócrino e, assim como humanos, também evidenciam sinais característicos de andropausa após determinada fase de vida. No entanto, um rato só pode ser considerado senil a partir do seu vigésimo quarto mês de vida em diante, fase em que o animal apresenta sinais típicos de envelhecimento como comprometimentos musculares (sarcopenia), neuronais, vasculares, aumento da adiposidade, problemas renais, dislipidemia, desmineralização óssea e comprometimento da androgênese e espermatogênese (BALARINI *et al.*, 2011; CAVASSANI *et al.*, 2011; HORNER, RUSS e BIKNEVICIUS, 2011; KIM *et al.*, 2011; SPEAR, L.P., 2000). Quando se avalia, por exemplo, uma variável simples como a massa testicular, observa-se reduções na mesma que são, em parte, decorrentes da menor produção espermática diária, como demonstrado em animais adultos por Dalsenter e colaboradores (1997). Aos 24 meses de idade os túbulos seminíferos de ratos apresentam regressão do epitélio seminífero e depleção celular, com presença de túbulos contendo apenas células de Sertoli, e uma redução significativa e

progressiva de 15 a 30% do diâmetro dos túbulos seminíferos quando comparados com animais de 90 dias (KOEVA *et al.*, 2009).

As alterações na função testicular em ratos senis (24 meses de idade) são também decorrentes da menor capacidade da hipófise em sintetizar e secretar FSH e LH, diminuindo a capacidade dos testículos de produzir testosterona, bem como uma menor capacidade das células de Leydig em responder as gonadotrofinas, em função da redução do seu número de receptores para LH (BEDRAK, CHAP e BROWN, 1983). Também em ratos de 12 meses de idade, considerados de meia idade, alterações significativas na função hipotalâmica-hipofisária foram observadas. Böttner *et al.*(2007) demonstraram que as concentrações séricas de LH são mais baixas em ratos de 12 meses, quando comparados com animais de 90 dias e que o perfil da secreção de LH é diferente. Os animais de 90 dias apresentaram amplitude média dos picos de LH (2,73 ng/mL) maiores do que animais de 12 meses (1,26 ng/mL), além de um menor intervalo entre os picos de LH (12,9 min em ratos de 90 dias *versus* 17,0 min nos de 12 meses), evidenciando o fenômeno da andropausa já em indivíduos de meia idade. Entretanto, de acordo com Gruenewald *et al.* (2000) a diminuição da função testicular em ratos senis decorre mais da redução da expressão do gene para o GnRH do que uma menor responsividade da hipófise ao GnRH.

Além das alterações hipotalâmico-hipofisárias, a atividade esteroidogênica das células de Leydig estão reduzidas em ratos durante o processo de envelhecimento (Koeva *et al.*, 2009). A expressão da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (11 $\beta$ -HSD do tipo 2), responsável por neutralizar os efeitos supressivos dos glicocorticoides sobre a função esteroidogênica das células de Leydig, declina progressivamente em ratos dos 18 aos 24 meses, ao mesmo tempo que ocorre uma redução significativa na expressão da enzima 3 $\beta$ -HSD, marcador da atividade esteroidogênica das células de Leydig, indicando a redução na síntese de androgênios. Segundo Gruenewald *et al.* (2000) os níveis séricos de testosterona são reduzidos em cerca de 20% em animais de 12 meses (0,85 ng/mL) e 50 % em animais de 24 meses (0,47 ng/mL) quando comparados com animais de 90 dias (1,05 ng/mL). Já Valle *et al.* (2008) reportam um redução de 70% ou mais em ratos de 18 meses (0,4 ng/mL), quando comparados com animais de 6 meses de idade

(1,3 ng/mL). Além disso, Koeva *et al.* (2009) também demonstraram uma redução na expressão dos receptores de androgênios, localizados nos núcleos das células de Sertoli, células de Leydig e células peritubulares, sugerindo uma menor responsividade destas células aos androgênios em animais senis.

Estudos prévios já testaram o impacto da fitoterapia em ratos como modelo experimental de andropausa. Em seu estudo, Sosic-Jurjevic *et al.* (2007) administraram isoflavonas da soja (genisteína e daidzeína) em ratos machos intactos e castrados com 16 meses de idade para avaliar o impacto das mesmas no perfil lipídico sérico dos animais com andropausa, utilizando também um grupo de testosterona como controle positivo. No final do experimento, as isoflavonas além de aumentarem a testosterona em 50%, reduziram os níveis de LDL em 30% quando comparados com grupos que não receberam a suplementação.

Em outro estudo, Hamden *et al.* (2008) avaliaram o impacto da suplementação do fitoterápico de origem turca *Peganum harmala* em ratos com 12 meses de idade, avaliando um possível efeito protetor do extrato nos processos oxidativos e no impacto da planta na concentração de testosterona nos testículos. No final do experimento, além do efeito protetor demonstrado pela diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) o grupo experimental demonstrou média de 60ng/g de testosterona enquanto a média do grupo controle foi de 38 ng/g.

### 2.3. Testosterona e Fitoterapia

O uso de drogas vegetais com o objetivo de alterar os níveis de hormônios androgênicos endógenos pode ser uma alternativa viável e mais segura para as pessoas da terceira idade. Já existem alguns estudos em modelo humano, sugerindo que a utilização de tais substâncias isoladas ou combinadas com precursores de esteróides sintéticos poderiam favorecer um aumento sérico de androgênicos, porém os dados são ainda controversos.

Brown *et al.* (2001) testaram, em homens com idade entre 30 a 58 anos, suplementos alimentares contendo 300 mg de androstenediol, 480 mg de *Saw palmetto*, 450 mg de indole-3-carbinol, 300 mg de crisina (5,7 diidroxiflavona), 1500 mg ácido gamalinoleico e 1350 mg de extrato seco de *Tribulus terrestris*

por dia, durante 28 dias. Ao final do tempo de suplementação a concentração de testosterona total e antígeno prostático específico (PSA) não se alteraram, porém houve aumento nos níveis séricos de androstenediona (174%), testosterona livre (37%), DHT (57%) e estradiol (86%).

El-Tantawy, Temraz e El-Gindi (2007) verificaram aumentos nos níveis séricos de testosterona após quarenta dias de suplementação com *Tribulus alatus* em ratos machos. Os autores sugerem que tal efeito pode ter sido causado pela alta concentração de saponinas presentes no extrato seco da planta. Por outro lado, Andrade *et al.* (2010) não conseguiram demonstrar ação androgênica direta ou aumento dos níveis de androgênios fecais em ratos machos suplementados por 28 dias com extratos de *Tribulus terrestris*. Bashir *et al.* (2009) verificaram aumento no tamanho dos túbulos seminíferos de ratos de 14 dias suplementados com 70mg/kg/dia de *Tribulus terrestris*.

O uso do Ginseng coreano (*Panax ginseng*) em humanos, segundo Andrade *et al.*(2007), melhorou o desempenho sexual em indivíduos que apresentavam disfunção erétil, porém sem provocar alterações nos níveis séricos de testosterona ou prolactina ao final da suplementação. No entanto, em outro estudo, ratos tratados por 60 dias com *Panax ginseng* apresentaram maiores níveis de testosterona, LH e FSH que o grupo controle (FAHIM *et al.*, 1982). Moundipa *et al.* (2005) analisaram o comportamento de células de Leydig *in vitro* de ratos Sprague-Dawley com 90 dias de idade tratadas com extrato etanólico de plantas indígenas típicas do país de Camarões (*Basella alba* e *Hibiscus macranthus*) . O extrato de *Basella alba* demonstrou aumentar de maneira dose-dependente a produção de testosterona pelas células de Leydig chegando a um percentual de 190% de aumento quando comparada ao grupo controle. No entanto quando as células foram expostas ao extrato de *Hibiscus macranthus* ocorreu o efeito oposto ao desejado. A produção de testosterona pelas células decresceu em 60% quando comparada ao controle.

A fitoterapia com o intuito de alterar níveis androgênicos pode ser utilizada de diversas formas. Alguns fitoterápicos, como o *Serenoa repens*, são utilizados com o objetivo oposto, ou seja, diminuir a resposta androgênica fisiológica, prescrição esta para tratar de doenças como hipertrofia de próstata (CAPODICE *et al.*, 2005). Figueiroa *et al.* (2009) também verificaram que fitoterápicos tais como as catequinas (polifenóis) do extrato seco de *Camellia*

*sinensis*, possuem a capacidade de reduzir os níveis de testosterona e LH séricos, a atividade de enzimas específicas envolvidas no processo de androgênese e a produção *in vitro* de testosterona pelas células de Leydig.

Outros fitoterápicos utilizados com o fim de aumentar as ações androgênicas no organismo incluem extratos de plantas do gênero *Pfaffia*, conhecidas como ginseng brasileiro, entre as quais encontra-se a *Pfaffia glomerata*, que é o tema deste estudo.

#### 2.4. Gênero *Pfaffia*

A *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen, pertence à família Amaranthaceae. Atualmente sabe-se da existência de aproximadamente 90 espécies de *Pfaffia* na América Central e América do Sul, sendo que, no Brasil, foram descritos 27 tipos. Entre os tipos de *Pfaffia* comercializados, as mais populares são a *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze e a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, ambas denominadas “ginseng brasileiro” (VIGO *et al.*, 2004; PINELLO *et al.*, 2006; GOSMANN *et al.*, 2003)

A *Pfaffia paniculata* é composta pelos fitoesteróides beta-sitosterol, beta-ecdisterona e estigmasterol, além de outros oligoelementos como: ácido pffáfico, alantoína, saponinas,  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucosídeo, stigmasterol- $\beta$ -D-glucosídeo (DASGUPTA e REYES, 2005; GOSMANN *et al.*, 2003). Já a *Pfaffia glomerata* difere da *Pfaffia paniculata* por sua maior concentração de saponinas (VIGO, NARITA e MARQUES, 2003) e ecdisterona (NAKAMURA *et al.*, 2010) além de conter ácido famérico, ácido glomérico, ácido oleanólico, monotriterpenóides e triterpenóides (GOSMANN e RATES, 2002; FLORES *et al.*, 2009; QUEIROGA, 2008). Os principais componentes da *Pfaffia glomerata* como a ecdisterona e as saponinas demonstram ser seguros para ingestão humana, sendo que as saponinas (triterpenóides) da família Amaranthaceae já tiveram citotoxicidade *in vitro* previamente avaliada sem demonstrar potencializar células cancerosas do cólon (MITAINE-OFFER *et al.*, 2001) e a ecdisterona possui toxicidade extremamente baixa, de maneira que em ratos apenas doses acima de 9g/kg apresentaram algum efeito colateral (TÓTH *et al.*, 2008).

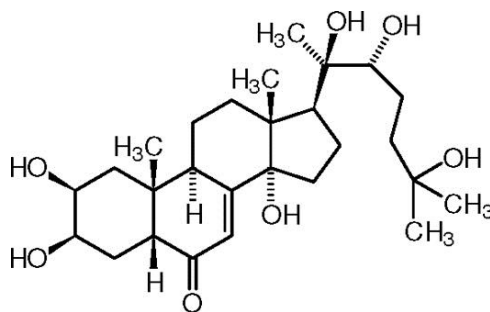
A aplicabilidade das plantas do gênero *Pfaffia* é variada e mesmo carecendo de mais pesquisas de eficácia farmacologia, seu nome popular de

“para tudo” é justificado pela sua diversidade de componentes. Tem sido indicada como agente anti-carcinogênico, tônico, revigorante, afrodisíaco, anti-inflamatório, anti-anêmico, regulador de glicemia e colesterolemia (PINELLO *et al.*, 2006; SILVA, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2007).

Em estudo realizado por Oshima e Gu (2003) foram analisados os efeitos da suplementação do pó da raiz de *Pfaffia paniculata* (pertencente à mesma família e gênero da *Pfaffia glomerata*) diluída em água sobre os níveis de hormônios sexuais em camundongos. Após 30 dias de suplementação, houve aumento nos níveis de estradiol e progesterona nas fêmeas e maiores níveis de testosterona nos machos ( $8,64 \pm 4,57$ ) quando comparados ao controle ( $4,37 \pm 2,39$ ). Os autores sugerem que o aumento dos respectivos hormônios pode ter sido ocasionado pelas saponinas presentes na *Pfaffia paniculata*.

Outro componente importante da *Pfaffia* é a ecdisterona (figura 3), estando presente na *Pfaffia glomerata* em maior quantidade e, portanto, sendo utilizada tanto como marcador químico no controle de qualidade da matéria prima (raiz) quanto para diferenciá-la de outros tipos de *Pfaffia* (GOSMANN *et al.*, 2003; FLORES *et al.*, 2009). A ecdisterona perfaz aproximadamente 1% da raiz em pó da *P. glomerata* (VIGO, NARITA e MARQUES, 2003) e pode ser extraída tanto em metanol quanto em clorofórmio (FLORES *et al.*, 2009). Os ecdisteróides são substâncias hormonais que foram encontradas primeiramente em insetos, estando relacionadas com sua reprodução e troca de muda (KIZELSZTEIN *et al.*, 2009). No entanto, em 1966 foi descoberto que estas mesmas substâncias estão presentes em aproximadamente 5% a 6% das espécies de plantas (TÓTH *et al.*, 2008; LAFONT e DINAN, 2003).

FIGURA 3- ESTRUTURA QUÍMICA DA BETA-ECDISTERONA



FONTE: GAO, CAI e SHI (2008).

A beta-ecdisterona ou simplesmente ecdisterona é um fitoesteróide, cujas funções têm sido amplamente estudadas. Sua funcionalidade anabólica tem sido amplamente divulgada na internet e também no meio esportivo. Citada frequentemente como “O Segredo Russo”, por ter sido muito utilizada antigamente por atletas olímpicos russos, a ecdisterona ou suplementos esportivos com esse composto, tem ganhado espaço e fama por sua sugerida mimetização dos efeitos anabólicos dos esteróides androgênicos sintéticos (aumento dos níveis de testosterona, da massa muscular, força e síntese protéica e diminuição da gordura corporal) sem, no entanto, os efeitos deletérios dos mesmos (BIZEC *et al.*, 2002; WILBORN *et al.*, 2006). Os estudos dos efeitos *in vivo* dos ecdisteróides em mamíferos são difíceis de serem realizados, em função do seu rápido catabolismo e eliminação (KIZELSZTEIN *et al.*, 2009) e os poucos resultados disponíveis permanecem bastante controversos.

Em experimento em ratos (TOTH *et al.*, 2008) a aplicação subcutânea de 5mg/kg de ecdisterona promoveu aumento notável no número de núcleos das fibras musculares, possivelmente por ativação das células satélites, e também no diâmetro da secção transversal das fibras musculares, sendo, inclusive, sugerido pelos autores, como uma possível alternativa para o uso de anabólicos sintéticos em terapias contra atrofia muscular como a que ocorre naturalmente no processo de envelhecimento (LYNCH *et al.*, 2007). Em contrapartida, no estudo realizado por Wilborn *et al.* (2006) com homens que receberam a suplementação de 200 mg/dia de ecdisterona, não foi encontrada nenhuma alteração na força máxima, redução de percentual de gordura ou

níveis de testosterona séricos, o que levou os autores a questionarem a ação ergogênica da ecdisterona em indivíduos saudáveis e treinados.

## 2.5. Ginseng Brasileiro

A *Pfaffia glomerata* é também conhecida e comercializada como “ginseng-brasileiro” devido à sua semelhança morfológica com o *Panax ginseng* da Coreia. Outro nome popular pelo qual é conhecida é “para-tudo” devido à ampla gama de indicações de uso, particularmente por populações indígenas (PINELLO *et al.*, 2006; GOSMANN *et al.*, 2003). O Ginseng coreano é diferente do brasileiro, na sua composição e na sua aplicabilidade, sendo que alguns estudos já demonstraram o sucesso da administração desse fitoterápico no tratamento de disfunções eréteis e também no aumento dos níveis séricos de testosterona (MACKAY, 2004; ANDRADE *et al.*, 2007; FAHIM *et al.*, 1982).

A *Pfaffia glomerata* possui porte arbustivo, podendo atingir até 2 metros de altura, com caules finos e eretos, e folhas que vão de 5 a 12 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura. As flores são polígamo-monóicas, que vão de 4 a 8 mm de diâmetro, sépalos estreito-elípticos de 2-3 mm de comprimento e filamentos ciliados em seu ápice (Montanari-Junior, 2005). A aplicabilidade medicinal do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) parece ampla, justificando seu apelido de “para-tudo”, e depende muito da extração e da parte da planta que é utilizada. Sanches *et al.* (2001) demonstraram que o extrato butanólico de *Pfaffia glomerata* possui atividade anti-hiperglicemiante, outra similaridade com o ginseng coreano (*Panax ginseng*). Neto *et al.* (2005) demonstraram que o extrato hidroalcoólico das raízes de *Pfaffia glomerata* podem possuir alguma atividade analgésica e/ou anti-inflamatória através da redução de indicadores inflamatórios (prostaglandinas) em ratos, no entanto, Queiroga *et al.* (2008) demonstraram posteriormente, também em ratos, que o extrato metanólico das raízes também apresenta atividade anti-inflamatória, reduzindo o edema de patas de ratos em 60,27% comparado ao grupo controle. No entanto, a popularidade e o baixo custo do ginseng brasileiro, se comparado ao coreano (em consulta informal feita em várias farmácias na cidade de Curitiba, o preço do ginseng brasileiro na maioria dos estabelecimentos consultados

chegava a ser 50% mais barato), podem fazer com que as pessoas procurem empregá-lo com a mesma finalidade que o ginseng coreano. No entanto, não se conhece a aplicabilidade do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) como tônico, revigorante sexual e seu possível impacto em alguns hormônios.

Por este motivo, o propósito deste estudo foi avaliar o impacto da suplementação do ginseng brasileiro nos níveis de testosterona em ratos machos, bem como uma possível resposta androgênica e/ou anti-androgênica em órgãos responsivos a androgênios. Sabendo-se ainda de que o ginseng brasileiro é fonte de beta-ecdisterona, procurou-se avaliar também uma possível resposta anabólica utilizando análise histológica de fibras musculares seccionadas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar os possíveis efeitos androgênico-anabólicos da suplementação de *Pfaffia glomerata* em ratos machos intactos em fase de declínio reprodutivo bem como possíveis efeitos androgênicos e/ou anti-androgênicos diretos, em animais pré-púberes castrados.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o impacto da suplementação de *Pfaffia glomerata* durante 28 dias nos níveis séricos de testosterona em ratos machos intactos;
- b) Avaliar o impacto da suplementação de *Pfaffia glomerata* durante 28 dias nos níveis de androgênios fecais em ratos machos intactos;
- c) Avaliar o impacto da suplementação de *Pfaffia glomerata* durante 28 dias no peso e atividade de órgãos sensíveis a androgênicos em ratos intactos;
- d) Avaliar o impacto da suplementação de *Pfaffia glomerata* durante 28 dias no diâmetro de fibras musculares esqueléticas específicas em ratos intactos;
- e) Avaliar o efeito da suplementação de *Pfaffia glomerata* durante 28 dias na atividade espermatogênica de ratos intactos, determinada pela análise da circunferência de túbulos seminíferos e total de espermátides no testículo.
- h) Avaliar efeitos androgênicos e/ou anti-androgênicos por meio da resposta de órgãos andrógeno-dependentes em ratos machos pré-púberes e castrados, suplementados por 10 dias com *Pfaffia glomerata*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Extrato seco de *Pfaffia glomerata*

Extrato seco da raiz de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen, Amaranthaceae (Ginseng Brasileiro®) fornecido por Herbarium Laboratório Botânico (Colombo, Paraná, Brasil) padronizado em 0,91% de ecdisterona, umidade máx: 2%.

### 4.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com aproximadamente 8 meses de vida e reprodutores de descarte do programa de reprodução do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. O descarte foi determinado em função do declínio do índice reprodutivo dos mesmos, indicado pelo menor número de fêmeas positivas para prenhez e número de filhotes por fêmea. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (33 cm de largura, 40 cm de profundidade e 16,5 cm de altura), em número de dois animais por caixa, porém separados por uma divisória metálica, sob ciclo de 12 horas (claro/escuro) e temperatura controlada ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Receberam ração Nuvital CR1 peletizada para ratos (informações no anexo 2) e água à vontade.

Para o teste de androgenicidade com ratos castrados (item 4.4) foram utilizados ratos Wistar machos, pré-púberes, com 7 semanas de vida, também provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (certificado número 513 de 01/03/2011).

### 4.3. Experimento crônico de curta duração em ratos intactos

#### 4.3.1. Tratamento

Os animais com 8 meses de idade receberam o tratamento por 28 dias. Para tanto, o extrato seco de *Pfaffia glomerata* era pesado, posteriormente dissolvido em água destilada (veículo), homogeneizado manualmente (processo que durava entre 3 a 5 minutos por grupo-tratamento) e administrado por gavagem (figura 4) no volume de 5 mL/kg de peso corporal. Cada grupo experimental teve um n = 12, distribuídos aleatoriamente em Grupo Controle (C), os quais receberam 5 mL/kg de peso de água destilada, ou em um dos três grupos tratados com extrato de *Pfaffia*, nas doses de 8,5 mg/kg(P8,5), 30 mg/kg (P30) e 85 mg/kg (P85). A menor dose (8,5 mg/kg/dia) corresponde, aproximadamente, a dose usual utilizada e prescrita para humanos (aproximadamente 600 mg/dia para um indivíduo de 70 kg), a dose de 30 mg/Kg corresponde a dose humana com correção alométrica para os ratos, conforme equação abaixo, e a dose mais alta corresponde a 10 vezes a dose prescrita para humanos.

$$\text{DoseTotalRatos} = \frac{\text{DoseTotalModeloHumano} \times \text{PesoMetabólicoAnimalModelo}}{\text{PesoMetabólicoModeloHumano}}$$

FIGURA 4- GAVAGEM



Administração por gavagem. Foto retirada durante o experimento. CURITIBA-PR, 2011.

#### 4.3.2. Avaliação dos efeitos da suplementação com *Pfaffia glomerata*

##### 4.3.2.1. Pesagem de fígado, rins e órgãos sensíveis a andrógenos

Foram determinados os pesos absolutos e relativos (peso do órgão/peso corporal x 100) dos órgãos sensíveis a andrógenos: testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal (com glândulas coaguladoras) e músculo levantador do ânus (LABC). Órgãos como fígado e rins foram pesados procurando avaliar um possível efeito tóxico da suplementação. A próstata foi pesada juntamente com a cápsula prostática enquanto a pesagem da vesícula seminal foi realizada após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem. Na figura 5 está demonstrada a técnica para a coleta do músculo (LABC).

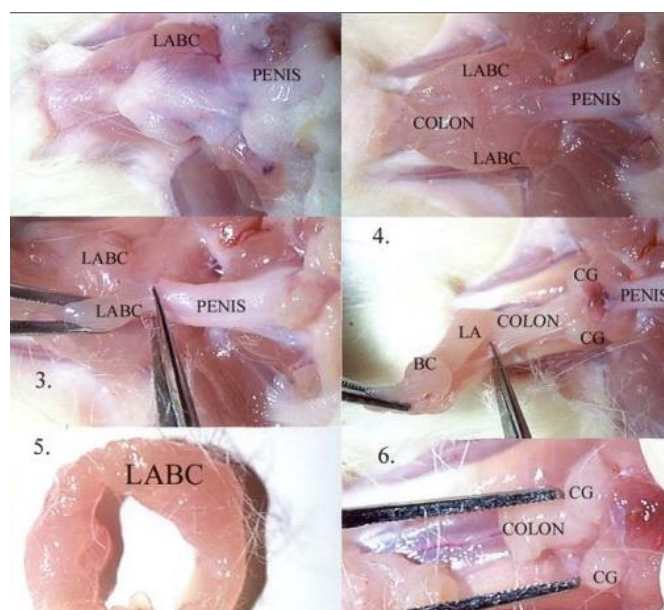


Figura 5 - Coleta do músculo levantador do ânus (LABC) – Lead Laboratory for the Hershberger Validation Program, 2000.

##### 4.3.2.2. Extração e dosagem de androgênios fecais

Amostras fecais de 24 h foram coletadas diretamente da caixa do animal nos dias 1, 7, 14 e 28 de tratamento e, após envase em sacos plásticos identificados, foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento. Para a secagem, as amostras foram transferidas para estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  e mantidas

durante aproximadamente 24 horas, sendo então pulverizadas manualmente, utilizando-se de um martelo emborrachado. Após a pulverização as amostras foram transferidas para microtubos de centrifuga, previamente identificados e novamente congeladas.

Para a extração, uma alíquota (de 0,45g a 0,55g) foi pesada em tubos de vidro e, a seguir, em cada tubo foram adicionados 4 mL de etanol e 1 mL de água destilada, seguida de agitação rápida em vórtex. Em seguida, os tubos foram tampados e agitados por turbilhamento, com pulsos de 1-2 segundos, durante 30 minutos em agitador de multi pulso (Multi-Pulser Vortexer, modelo 099AVB4, 50-60 Hz, Glass Col®) e centrifugados ( $1000 \times g$  por 15min) e o extrato sobrenadante foi transferido para um tubo tipo eppendorf previamente identificado e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até análise.

A dosagem de testosterona fecal foi feita por enzima imunoenensaio (ELISA – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), utilizando o anticorpo anti-testosterona R156/7 e testosterona conjugada com HRP (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA). Antes do início dos ensaios, foi feita a validação do método para os extratos fecais de ratos para identificar a existência de similaridade imunogênica entre o antígeno utilizado como padrão no ensaio e o antígeno a ser dosado na amostra (Touma e Palme, 2005). Um dos métodos de validação é o paralelismo entre a curva padrão e a curva das amostras a serem testadas, o qual verifica a similaridade imunogênica e determina a diluição mais apropriada para as amostras do estudo. Desta forma, uma mistura de 40 amostras de extratos fecais foi diluída por 12 vezes de forma seriada, iniciando-se na proporção de 1:1 e indo até 1: 512 (extrato: diluidor de ELISA). A curva de concentração em relação ao percentual de ligação obtida é chamada de curva de validação da amostra, e se esta curva for paralela à curva padrão do ensaio, isto é interpretado como similaridade imunogênica entre os dois antígenos e o método de dosagem pode ser utilizado (BROWN et al, 2004). O ensaio de validação demonstrou similaridade imunogênica entre os androgênios fecais e a testosterona utilizada como padrão e a diluição ideal para a dosagem dos extratos fecais foi determinada como sendo de 1:64, já que foi a diluição que mais se aproximou do ponto central da curva padrão (~50% de ligação) conforme demonstra a figura 3.

#### 4.3.2.3. Dosagem de testosterona sérica

Um dia após o último tratamento, os ratos foram decapitados e o sangue coletado e coagulado em temperatura ambiente. Após centrifugação, as amostras de soro foram transferidas para tubos limpos e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise dos níveis de testosterona por ELISA (conforme já descrito no item 3.3.2.2).

#### 4.3.2.4. Contagem de espermátides

Após remoção da túnica albugínea, o testículo esquerdo de cada animal foi transferido para tubo contendo 10 mL de solução fisiológica com 0,5% de Triton X-100 e homogeneizado por 1 minuto em homogeneizador de tecidos (FISATOM 720). O homogeneizado foi diluído 10 vezes em salina para a contagem do número de espermátides resistentes a homogeneização (espermátides nos estágios 17 a 19) em câmara de Neubauer (Bürker, Alemanha). O número de espermátides por animal foi dividido por 6,1 dias para a conversão em produção espermática diária. Esse divisor (6,1) corresponde ao número de dias do epitélio seminífero em que as espermátides se encontram nos estágios 17 a 19 (ROBB, 1978). Como os animais tiveram um dos testículos utilizado para a histologia testicular, o número de espermátides contadas foi multiplicado por dois para estimar o número de espermátides por animal (AMANN, 1976).

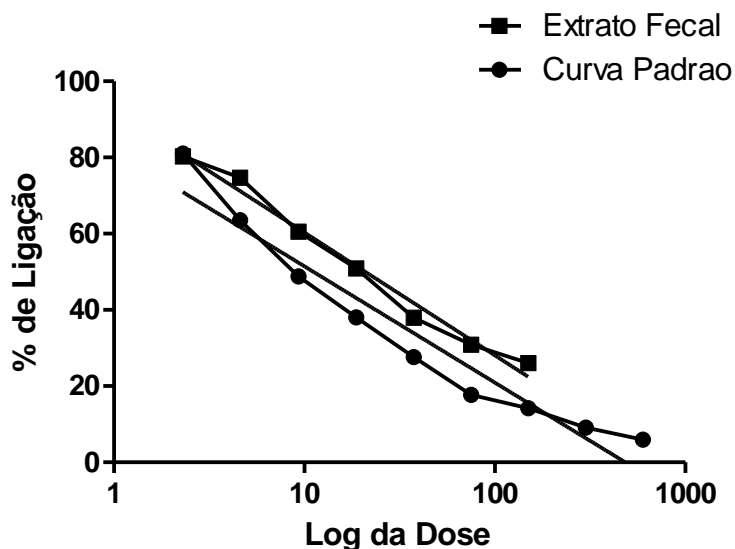


FIGURA 6: CURVAS DO LOGARÍTIMO DA CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA EM RELAÇÃO AO PERCENTUAL DE LIGAÇÃO DO HORMONIO CONJUGADO COM HRP PARA OS PADRÕES E DILUIÇÃO SERIADA DE POOL DE EXTRATOS FECAIS DE RATOS, DEMONSTRANDO PARALELISMO ENTRE AS MESMAS ( $R^2 = 0,98$ ). A DILUIÇÃO QUE MAIS SE APROXIMOU DO PONTO CENTRAL DA CURVA PADRÃO FOI DE 1:64. CURITIBA-PR, 2011.

#### 4.3.2.5. Histologia testicular

Imediatamente após o sacrifício, o testículo direito de cada animal foi retirado e, após a perfuração da túnica albugínea, fixado em solução de ALFAC (100 mL: 85 mL de álcool 80%, 10 mL de formaldeído e 5 mL de ácido acético glacial) por seis horas. Transcorridas as duas primeiras horas de fixação, os testículos foram retirados da solução e seccionados transversalmente em cortes de aproximadamente 2,0 mm. Após a fixação, os fragmentos foram mantidos em etanol 70% e, posteriormente, desidratados com concentrações crescentes de etanol e xilol: etanol 80% (1h30min); etanol 90% (1h30min); etanol 95% (1h30min); etanol absoluto (3 tempos de 30 min); xilol: etanol (1:1; 12h na geladeira); xilol absoluto (2 tempos de 20min e um tempo de 5 min). Após a desidratação, as peças foram impregnadas em parafina (Histosec<sup>®</sup> - Merck, Alemanha) durante 3 horas a 56°C, e subsequentemente emblocadas.

Foram realizados cortes transversais de 3 µm de espessura (Micrótomo Leica RM 2145, Alemanha) que foram corados com hematoxilina/eosina para posterior análise histológica (BEÇAK e PAULETE, 1976).

Em cada testículo foi realizada a medida do diâmetro dos túbulos seminíferos (menor diâmetro) em 20 secções transversais de túbulos escolhidas ao acaso e apresentando contorno o mais circular possível. As medidas foram feitas com o auxílio de ocular micrométrica em aumento de 100x através da versão 3.0 do software de UTHSCSA Image Tool. Além disso, 100 secções de túbulos de cada testículo foram analisadas microscopicamente em aumento de 400x para determinar o percentual de túbulos com espermatídes alongadas, isto é, túbulos nos estágios I – VIII e XII – XIV, sendo que um estágio ou associação celular é definido como um conjunto de células germinativas que podem ser observadas numa secção transversal de túbulo e, no rato, são definidas 14 associações celulares distintas (FOSTER, 1988).

#### 4.3.2.6. Histologia músculo-esquelética

Para avaliar possíveis efeitos anabólicos do tratamento com *Pfaffia glomerata*, foram coletados os músculos sóleo da pata direita dos ratos, os quais foram fixados em ALFAC e preparados para análise histológica de rotina (conforme item 3.3.2.5.). Foi mensurada a área total de 100 fibras musculares seccionadas de cada animal. Foram escolhidos 5 campos aleatórios e cada campo teve 20 fibras avaliadas (ZHANG *et al.*, 2010) com o auxílio de ocular micrométrica em aumento de 100x através da versão 3.0 do software de UTHSCSA Image Tool

#### 4.4. Teste de androgenicidade e anti-androgenicidade usando ratos machos castrados – Teste de Hershberger

O Teste de Hershberger baseia-se no crescimento de tecidos andrógeno-dependentes em ratos machos castrados (androgenicidade) bem como no bloqueio da ação trófica da testosterona (antiandrogenicidade) sobre esses órgãos (OWENS *et al.*, 2006). O Teste de Hershberger faz parte de uma metodologia para testar o potencial (anti) androgênico validada pela OECD

(The Organization for Economic Cooperation and Development) desde 1997 (OECD, 1998), utilizando animais pré-púberes castrados

Ratos pré-púberes (sete semanas de idade) foram anestesiados com 75 mg de ketamina/kg (Vetanarcol<sup>®</sup> - Konig, Argentina) e 1,5 mg de xilazina/kg (Rompun<sup>®</sup> - Bayer, São Paulo/SP) pela via intraperitoneal e castrados através de uma única incisão na bolsa escrotal. Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção subcutânea (0,1 mL/100g de peso corporal) de Agropen L.A.<sup>®</sup> (Virbac, França: penicilina G procaína 10.000.000 UI; penicilina G benzatina 10.000.000 UI; sulfato de dihidroestreptomicina 20 g; veículo q.s.p 100 mL) e Dipirona (66mg/kg). O tratamento foi iniciado sete dias após a cirurgia para permitir a completa recuperação dos animais.

Neste experimento foi utilizado extrato de *Pfaffia glomerata*, propionato de testosterona (Sigma - Alemanha) e flutamida. O óleo de canola e água destilada foram utilizados como veículo. Os ratos machos castrados (n=9/grupo) foram tratados por via oral e subcutânea durante dez dias consecutivos. Na avaliação da androgenicidade três doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (8,5, 30 e 85 mg/kg/dia) foram administradas oralmente a animais que também receberam o veículo oleoso por via subcutânea (1,0 ml/kg/dia). Os animais controle positivo para androgenicidade receberam a administração conjunta de propionato de testosterona por via subcutânea (0,25 mg/kg/dia) e água destilada por gavagem (5,0 mL/kg/dia), enquanto o controle negativo de androgenicidade recebeu apenas veículo por ambas as vias. Para avaliar os possíveis efeitos antiandrogênicos da *Pfaffia glomerata*, um grupo de animais foi tratado simultaneamente com 85mg/kg de extrato de *Pfaffia glomerata* e 0,25 mg/kg/dia de propionato de testosterona. Para o grupo controle positivo de antiandrogenicidade, os animais receberam simultaneamente o veículo aquoso por gavagem, 0,25 mg/kg/dia de propionato de testosterona e 10,0 mg/kg/dia de flutamida via subcutânea. Os volumes de administração utilizados serão de 5,0 mL/kg para via oral e 1,0 mL/kg para a via subcutânea.

Vinte e quatro horas após o último dia de tratamento os animais foram pesados e sacrificados. A próstata e vesícula seminal (com glândulas coaguladoras) foram retiradas e pesadas após a remoção cuidadosa de gordura e tecidos adjacentes. A próstata foi pesada juntamente com a cápsula prostática e a vesícula

seminal sem o seu conteúdo. Os pesos absolutos foram registrados e corrigidos para o peso corporal. Além da próstata e vesícula seminal, foi aferido o peso do fígado, dos rins, do músculo levantador do ânus (LABC) e a glândula do pênis.

#### 4.5. Controle Histórico

Para detectar o declínio reprodutivo em algumas das variáveis estudadas, como o peso de órgãos andrógeno-sensíveis e andrógeno-dependentes, níveis de testosterona sérica e produção espermática, os dados dos animais de 8 meses foram comparados aos de animais com 90 dias de vida (Quadro 1) retirados de artigos publicados pelos laboratórios de toxicologia reprodutiva e fisiologia endócrina e reprodutiva do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Selecionamos os estudos que continham as mesmas variáveis estudadas e os animais controle eram de 90 dias, idade esta em que o animal apresenta maturidade do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Gruenewald *et al.*, 2000).

Variáveis	Martino- Andrade <i>et al.</i> (2002)	Dalsenter <i>et al.</i> (2004)	Araújo, S.L. (2005)	Cantarutti, T. F. (2005)	Dallegrave <i>et al</i> (2007)	Bufalo, A.C. (2007)	Martino- Andrade <i>et al.</i> (2010)
Testosterona sérica (ng/ml)	0,64						0,53
Androgênios Fecais (ng/g)							31,32
Próstata (%)	0,15±0,04	0,13±0,02	0,12±0,01	0,09±0,02	0,13±0,01	0,1±0,02	0,08±0,05
Vesícula (%)	0,2±0,03	0,2±0,02	0,21±0,02	0,14±0,04	0,2±0,01	0,17±0,01	0,13±0,05
Epidídimos (%)	0,16±0,01	0,16±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01		0,14±0,02	0,15±0,56
Rins (%)			0,32±0,5	0,32±0,08		0,29±0,2	0,34±0,01
Fígado (%)				3,36±0,6		2,71±0,4	3,43±0,07
Testículos (%)	0,41±0,03	0,44±0,05	0,42±0,04	0,4±0,03		0,42±0,03	0,51±0,01
Espermátides (milhões)	267±61,3	255±52,1		241±53,2			
Espermátides/dia (milhões)	42,8±8,74	40,9±7,48	60,8±6,12	47,9±2,2	20,5±1,7	58,3±4,4	
Diâmetro túbulos (µm)	265±9,31				180,8±0,3		

QUADRO 1 - MÉDIA (±EPM) DO CONTROLE HISTÓRICO DE 90 DIAS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS EM ESTUDOS PRÉVIOS DOS GRUPOS DE PESQUISA EM TOXICOLOGIA REPRODUTIVA E FISILOGIA ENDÓCRINA E REPRODUTIVA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ CURITIBA – PR, 2011.

#### 4.6 Análise Estatística

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise descritiva e as diferenças entre os valores médios obtidos para os diferentes grupos foram avaliadas por ANOVA, seguida de teste de Tukey para as medidas não repetidas e por ANOVA de duas vias (tempo x tratamento), seguida do pós teste de Bonferroni, para os dados de androgênios fecais. As comparações entre os valores médios históricos dos animais com 90 dias e os animais de 8 meses do grupo controle, quando possíveis, foram feitas com teste *t* de Student. Para todos os testes as diferenças foram consideradas significativas com um nível de probabilidade de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da suplementação com *Pfaffia glomerata* em ratos intactos

#### 5.1.1. Análise do peso dos órgãos sensíveis a andrógenos

Os valores médios obtidos para a massa corporal total e massa dos testículos, epidídimos, rins, próstata, vesícula seminal, fígado e músculo levantador do ânus (LABC) de todos os ratos após o sacrifício são apresentados na Tabela 1. O peso dos animais é apresentado em valor absoluto, enquanto a massa dos órgãos e tecidos é apresentada tanto em peso absoluto como em peso relativo ao peso do animal. Para os órgãos pares, a medida foi feita em separado, porém os dados são apresentados como média das duas medidas. Não houve diferença significativa no peso dos órgãos e tecidos em nenhum dos grupos.

TABELA 1 –PESOS RELATIVOS (g%; MÉDIA±EPM) DOS ÓRGÃOS E TECIDOS PESADOS IMEDIATAMENTE APÓS O SACRIFÍCIO. NENHUMA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA FOI OBSERVADA ENTRE OS GRUPOS (n=12/GRUPO). CURITIBA –PR, 2011.

	Controle	Grupo 1 (8,5mg/kg)	Grupo 2 (30mg/kg)	Grupo 3 (85mg/kg)
<b>Próstata</b>	0,12 ± 0,07	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,11 ± 0,02
<b>Vesícula Seminal</b>	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,04
<b>Epidídimo</b>	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<b>Testículo</b>	0,37 ± 0,05	0,39 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,42 ± 0,05
<b>Rim</b>	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,03
<b>Fígado</b>	3,19 ± 0,51	3,24 ± 0,35	3,14 ± 0,40	3,09 ± 0,2
<b>LABC</b>	0,28 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,05

### 5.1.2 Análise de andrógenos fecais

Os resultados da análise dos androgênios fecais estão resumidos na figura 7, sendo apresentados como médias por grupo em cada dia de coleta de amostra. A análise de variância indicou ausência de interação entre tempo e tratamento, efeito significativo do tempo ( $p < 0,001$ ) e quase significativo para o tratamento ( $p = 0,08$ ), já que houve diferença significativa apenas para a média do grupo tratado com PG 85 mg/kg no dia 14, sendo as demais diferenças não significativas.

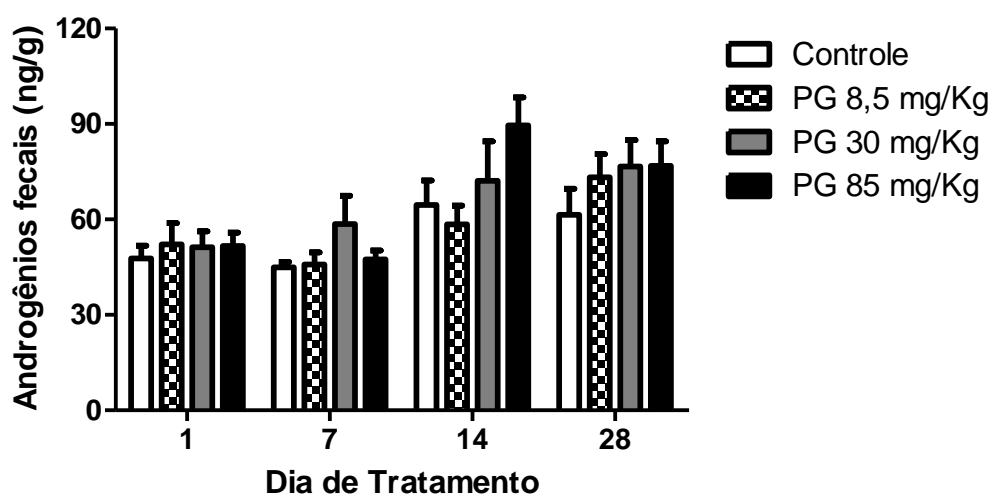


FIGURA 7: CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DIÁRIAS DE ANDROGÊNIOS FECAIS ( $\pm$ EPM) NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* E GRUPO CONTROLE. CURITIBA – PR, 2011.

### 5.1.3 Análise de testosterona sérica

Não foi observada diferença significativa entre as médias de cada grupo para a concentração sérica de testosterona ao final do período de suplementação (Dia 29). Os valores médios por grupo estão apresentados na figura 8.

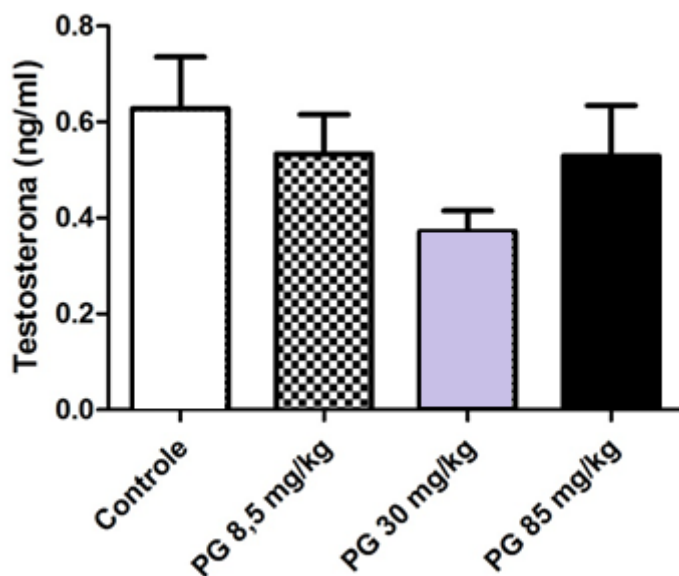


FIGURA 8: CONCENTRAÇÕES MÉDIAS ( $\pm$ EPM) DE TESTOSTERONA SÉRICA ENTRE OS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* E GRUPO CONTROLE. CURITIBA – PR, 2011.

#### 5.1.4 Contagem de espermátides

Não houve alterações significativas no número total de espermátides por testículo (em milhões) dos grupos suplementados com *Pfaffia glomerata* quando comparados com o grupo controle, conforme demonstra a figura 9.

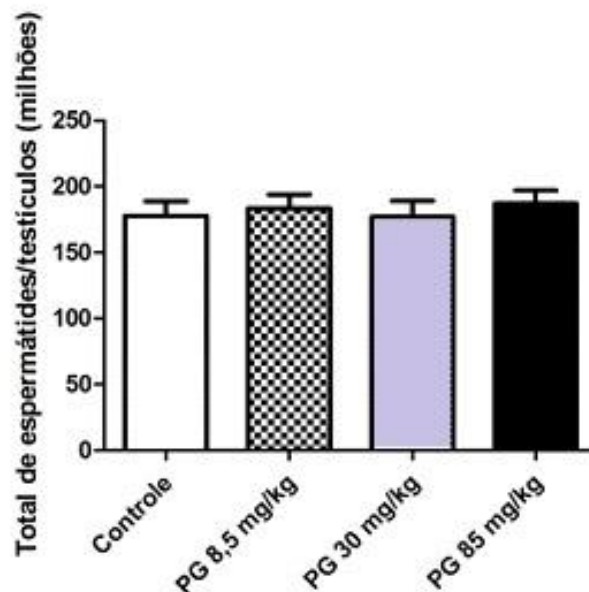


FIGURA 9: NUMERO TOTAL DA MÉDIA DE ESPERMÁTIDES POR TESTÍCULO ( $\pm$ EPM) NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* E GRUPO CONTROLE. CURITIBA – PR, 2011.

#### 5.1.5 Histologia testicular e músculo-esquelética

Após a análise de 20 túbulos (Fig. 10) e 100 fibras musculares por animal (Fig. 11), tanto a histologia testicular quanto a músculo-esquelética não revelaram diferenças no diâmetro dos túbulos seminíferos entre os grupos ( $P = 0,96$ ) e na área total das fibras musculares do músculo sóleo de pata direita dos animais ( $P = 0,44$ ). Nas figuras 12 e 13 são apresentados os valores médios observados por grupo.

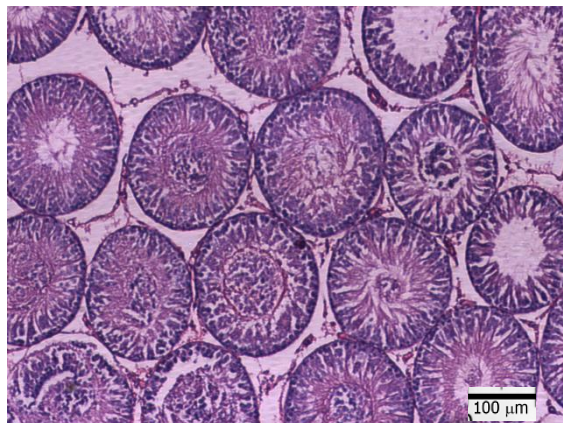


FIGURA 10 – EXEMPLO DE IMAGEM DE SECÇÃO TRANSVERSAL DE TESTÍCULOS DE UM ANIMAL DO GRUPO 1 (*Pfaffia glomerata*: 8,5 mg/Kg) EM AUMENTO DE 100X. CURITIBA- PR, 2011.

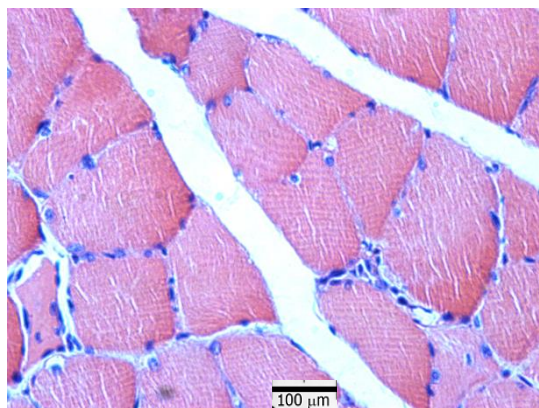


FIGURA 11 – EXEMPLO DE IMAGEM DE SECÇÃO TRANSVERSAL DE FIBRAS MUSCULARES DO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAL DO GRUPO 2 (*Pfaffia glomerata*: 35 mg/Kg), EM AUMENTO DE 100X. CURITIBA- PR, 2011.

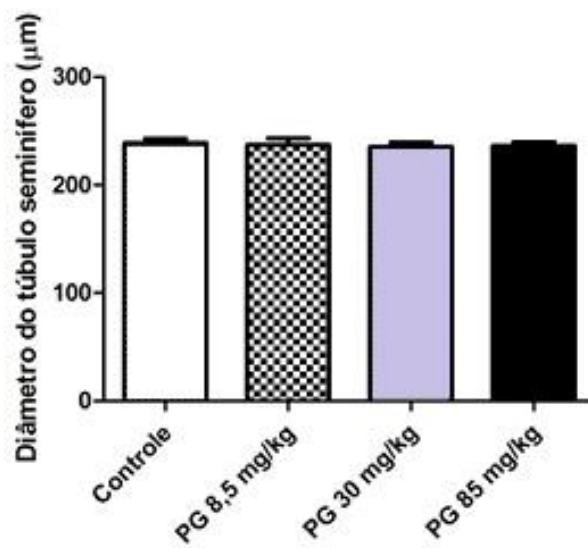


FIGURA 12: DIÂMETRO MÉDIO ( $\pm$ EPM) DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG) E GRUPO CONTROLE. CURITIBA – PR, 2011.

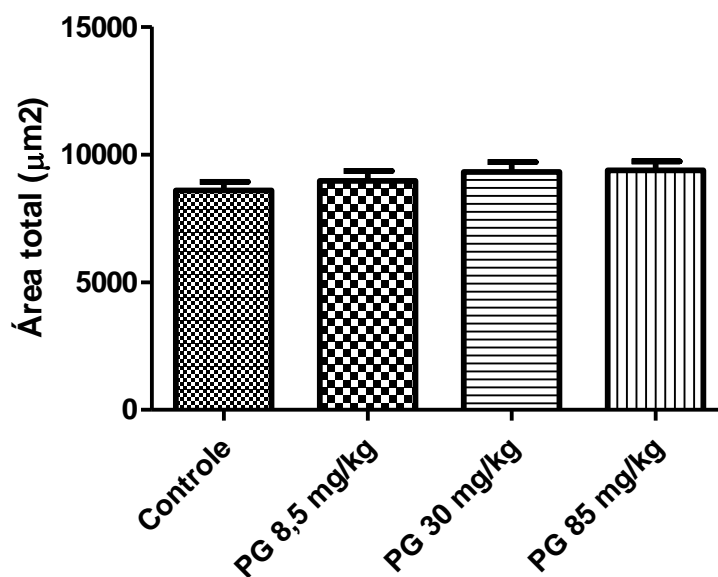


FIGURA 13: ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSAL MÉDIA ( $\pm$ EPM) DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DO MÚSCULO SÓLEO DIREITO DOS ANIMAIS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG) E GRUPO CONTROLE. CURITIBA – PR, 2011.

### 5.1.6 Teste de androgenicidade e anti-androgenicidade usando ratos machos castrados – Teste de Hershberger

Os pesos relativos de fígado, rins, músculo levantador do ânus (LABC), vesícula, glândula e próstata ao final do Teste de Hershberger são apresentados nas figuras 14 a 19, enquanto os pesos absolutos são apresentados na tabela 2. Com exceção do peso médio para fígado e rins, todos os demais órgãos tiveram valores médios de massa significativamente diferentes entre os diversos grupos, porém apenas quando comparados os valores dos controles e animais tratados com *Pfaffia glomerata* com aqueles obtidos para os controles positivo e negativo. Entretanto nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos tratados com *Pfaffia glomerata*, entre si, bem como em relação ao grupo controle. A *Pfaffia glomerata* também não demonstrou efeito anti-androgênico, pois o grupo tratado com testosterona e *Pfaffia glomerata* apresentou aumento de peso de órgãos similar ao grupo tratado apenas com testosterona e ainda houve diferença significativa entre o peso dos órgãos do grupo tratado com flutamida e testosterona em comparação com aqueles tratados com testosterona e *Pfaffia glomerata*.

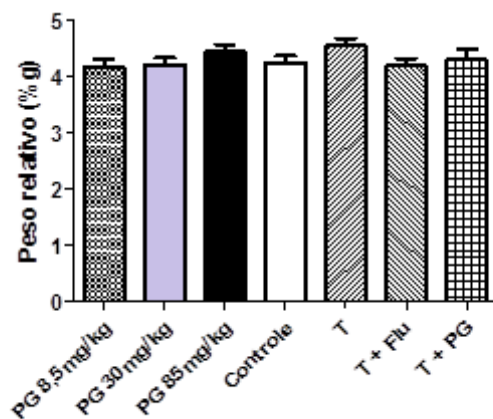


FIGURA 14: PESO RELATIVO MÉDIO ( $\pm$ EPM) DO FÍGADO NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T), TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA e *Pfaffia glomerata* (T + PG). CURITIBA – PR, 2011.

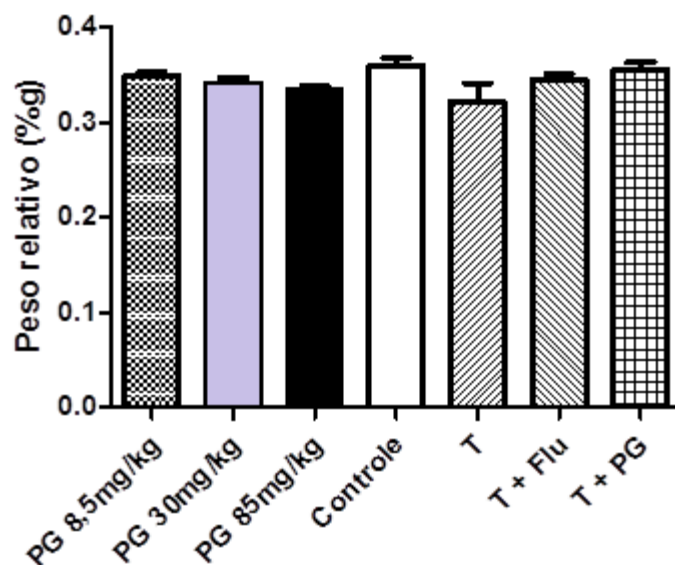


FIGURA 15: PESO RELATIVO MÉDIO ( $\pm$ EPM) DOS RINS NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T), TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E *Pfaffia glomerata* (T + PG). CURITIBA – PR, 2011.

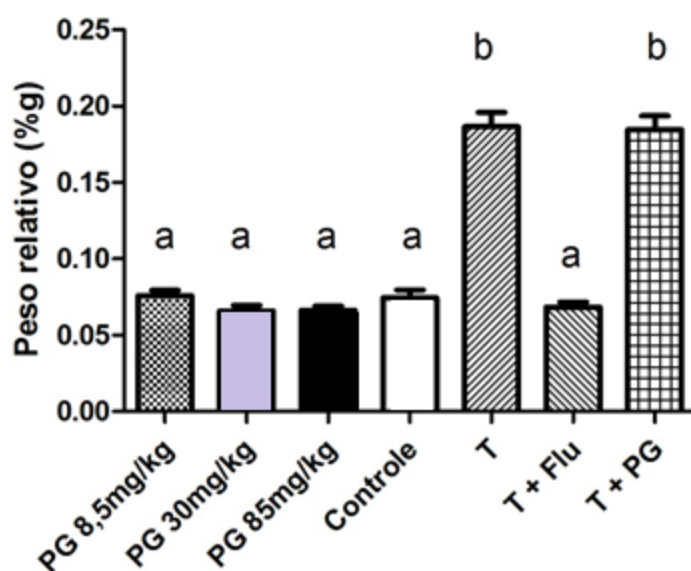


FIGURA 16: PESO RELATIVO MÉDIO ( $\pm$ EPM) DO MÚSCULO LEVANTADOR DO ÂNUS (LABC) NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T), TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu)

E TESTOSTERONA E *Pfaffia glomerata* (T + PG). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. CURITIBA – PR, 2011.

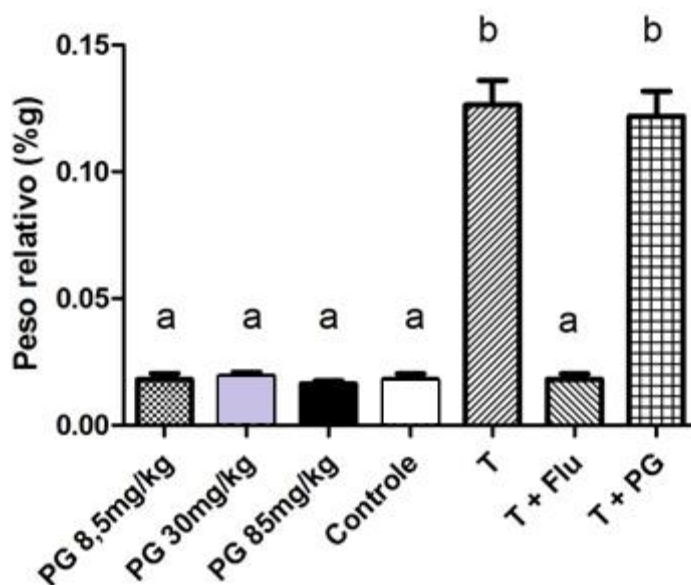


FIGURA 17: PESO RELATIVO MÉDIO ( $\pm$ EPM) DA VESÍCULA SEMINAL NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T), TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E *Pfaffia glomerata* (T + PG). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. CURITIBA – PR, 2011.

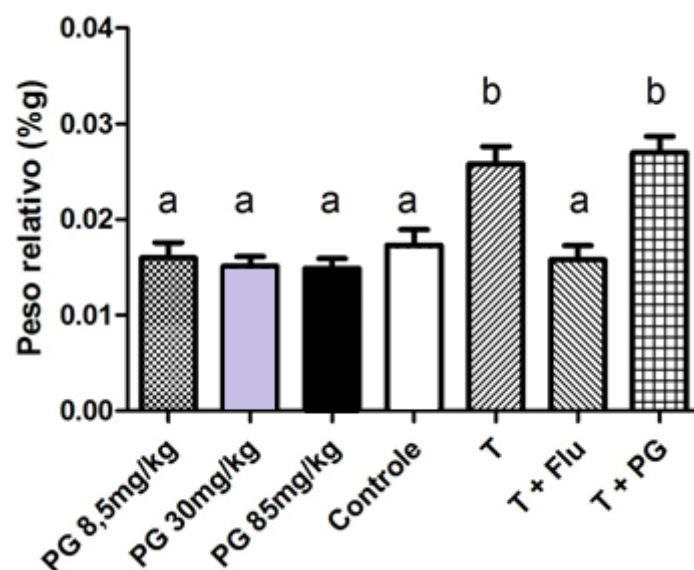


FIGURA 18: PESO RELATIVO MÉDIO ( $\pm$ EPM) DA GLANDE NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T), TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E *Pfaffia glomerata* (T + PG). CURITIBA – PR, 2011.

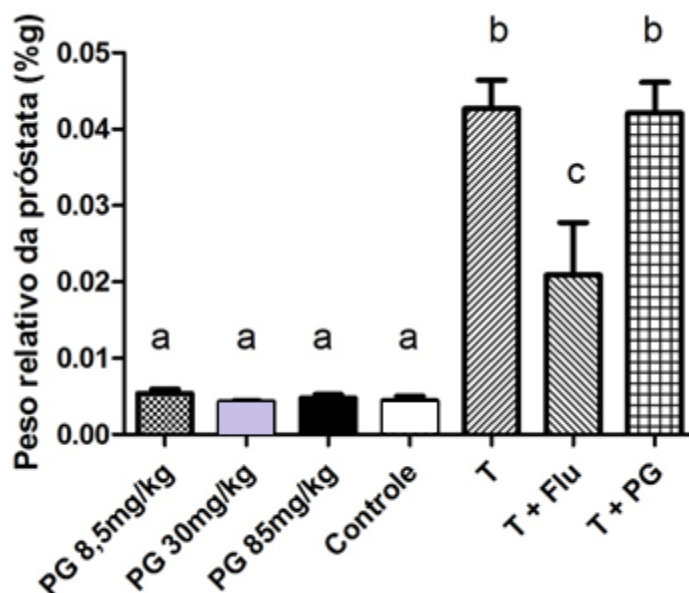


FIGURA 19: PESO RELATIVO MÉDIO ( $\pm$ EPM) DA PRÓSTATA NOS GRUPOS TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* (PG), CONTROLE, TESTOSTERONA (T), TESTOSTERONA E FLUTAMIDA (T + Flu) E TESTOSTERONA E *Pfaffia glomerata* (T + PG). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças

significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. CURITIBA – PR, 2011.

	Fígado	Rins	LABC	Vesícula	Glande	Próstata	Peso Corporal <sup>41</sup>
PG 8,5mg/kg	9,77 ± 1,21	0,81 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	234,3 ± 21,5
PG 30mg/kg	10,14 ± 1,37	0,81 ± 0,09	0,15 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	235,7 ± 24,4
PG 85mg/kg	10,48 ± 1,10	0,78 ± 0,08	0,15 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0	235,9 ± 26,3
Controle	9,92 ± 1,83	0,82 ± 0,09	0,17 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0	232,4 ± 35,9
Testosterona	11,73 ± 1,57	0,78 ± 0,08	0,47 ± 0,07	0,32 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,03	256,8 ± 26,1
Testosterona + Flutamida	10,02 ± 1,34	0,81 ± 0,10	0,16 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,05	237,6 ± 17,2
Testosterona + PG	10,54 ± 1,55	0,87 ± 0,10	0,45 ± 0,06	0,29 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,02	244,3 ± 20,3

TABELA 2 – PESOS ABSOLUTOS (g; Média ± EPM ) DOS ÓRGÃOS PESADOS IMEDIATAMENTE APÓS O SACRIFÍCIO, EM ANIMAIS PRÉ-PUBERES CASTRADOS, TRATADOS COM *Pfaffia glomerata* 8,5mg/kg, 30mg/kg e 85 mg/kg, Controle, Testosterona, Testosterona e Flutamida e Testosterona e *Pfaffia glomerata* 8,5mg/kg CURITIBA-PR, 2011.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizamos ratos de oito meses de vida como modelo experimental para avaliar a resposta da suplementação de *Pfaffia glomerata* nas concentrações de testosterona, bem como outras variáveis do sistema endócrino-reprodutivo. Os animais do presente estudo podem ser considerados adultos em início da fase senil de acordo com Horner, Russ e Biknevicius (2011) e Balarini *et al.* (2011), ainda que difícil estabelecer com exatidão as fases da vida em animais experimentais como o limite entre a adolescência e a fase adulta, a fase adulta e a velhice (AVITAL *et al.*, 2011).

Apesar do declínio reprodutivo, quando os animais do nosso estudo foram comparados a animais de 90 dias, em início da maturidade sexual (BOLANOS *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2011), os mesmos não demonstraram alterações na função reprodutiva de modo a poderem ser caracterizados como animais em estado de andropausa, ainda que já apresentassem declínio reprodutivo. Isto está de acordo com Hirshfield e Flaws (2006), os quais afirmam que 8 meses já é uma idade onde sinais de desordens no sistema endócrino-reprodutivo se manifestam. No entanto, segundo Zhang *et al.* (2010) tal idade não parece ser sinônimo de baixo desempenho sexual, pois nessa faixa etária ainda não é observada disfunção erétil como em animais idosos (24 meses de vida).

Quando analisamos as concentrações séricas de testosterona ao final do período de suplementação, os mesmos não diferiram entre os grupos, ou seja, tanto o grupo suplementado com o extrato de *Pfaffia glomerata* quanto o grupo controle não apresentaram diferenças significativas nos níveis de testosterona sérica. Também a análise dos metabólitos androgênicos totais nas fezes, a qual foi realizada em dias específicos ao longo de todo o período de suplementação, o que poderia acusar um aumento de testosterona (progressivo ou não) nos primeiros ou nos últimos dias de tratamento, não indicou flutuações significativas nos androgênicos fecais em quaisquer dias de suplementação. Os dados por nós obtidos são muito semelhantes àqueles obtidos previamente por Martino-Andrade (2010), os quais também não observaram variações significativas nas concentrações de androgênios fecais

dos animais tratados com *Tribulus terrestris* com metodologia parecida ao presente estudo.

Entretanto, ainda que os valores médios obtidos para os níveis de androgênios séricos e fecais não tenham diferido entre os grupos, não podemos afirmar que o mesmo aconteceria em humanos que fazem uso da do extrato de raiz de *Pfaffia glomerata*, já que os resultados podem ser muito distintos quando se trabalha com espécies diferentes, assim como ocorreu com o próprio ginseng coreano com Andrade *et al.*(2007), que não encontraram qualquer alteração nos níveis de testosterona em humanos, em oposição aos achados de Fahim *et al.* (1982), os quais já relataram previamente um aumento nos níveis de testosterona de ratos suplementados por 60 dias com *Panax ginseng*.

Nossos resultados também diferiram dos resultados obtidos por Oshima e Gu (2003), em experimentos similares com planta do mesmo gênero e família (*Pfaffia paniculata*), porém com metodologia e/ou espécies distintas. Enquanto no nosso estudo nenhum efeito do extrato da *Pfaffia glomerata* foi observado nos níveis de androgênios tanto fecal como sérico, os autores relatam um aumento de 97% nos níveis de testosterona sérica dos animais suplementados com *Pfaffia paniculata* (5 g de pó da raiz/100 mL na água de beber), talvez o tipo de metodologia utilizada (ex: o autor utilizou radioimunoensaio ao invés de ELISA) e de animais (camundongos jovens ao invés de ratos idosos) possam ser alguns dos fatores responsáveis pela discrepância de resultados. Ainda é ponderável considerar que essa diferença poder ser devida a diferenças na composição das saponinas encontradas na *Pfaffia glomerata* (ácido famérico, ácido glomérico, ácido oleanólico, notritepenóides e triterpenóides e ecdisterona; GOSMANN e RATES, 2002; FLORES *et al.*, 2009; QUEIROGA, 2008) que diferem das saponinas encontradas na *Pfaffia paniculata* (beta-sitosterol, beta-ecdisterona e estigmasterol, ácido pffáfico, allantoina, beta-sitosteril-b-D-glucosídeo, stigmasteril-beta-D-glucosídeo (DASGUPTA e REYES, 2005; GOSMANN *et al.*, 2003).

Martino-Andrade *et al.* (2010) também não verificaram ação direta do extrato de *Tribullus terrestris* () nos níveis séricos de testosterona em ratos após vinte e oito dias de suplementação, no entanto, El-Tantawy, Temraz e El-Gindi (2007) verificaram uma média de 21,3 *pg/ml* ( $\pm 0,882$ ) contra 0,72 *pg/ml*

( $\pm 0,048$ ) ou seja, um aumento de quase 30 vezes nos níveis séricos de testosterona de ratos após quarenta dias de suplementação com *Tribulus alatus*. Paralelamente, os dados de Brown *et al.* (2001) indicam que em humanos o extrato desta planta é capaz de aumentar a concentração de testosterona plasmática livre em até 37%, percentual que poderia ser significativo em um idoso ou em um homem adulto já em fase de declínio de androgênicos e seus metabólitos.

No entanto, mesmo as diferenças não sendo estatisticamente significativas, é possível observar que os androgênios séricos parecem aumentar do dia 14 para o dia 28, o que poderia sugerir que o tempo de tratamento possa ter sido muito curto para este fitoterápico demonstrar efeitos notórios, pois em estudos prévios e com outros fitoterápicos, conforme demonstrou El-Tantawy, Temraz e El-Gindi (2007) com a suplementação de *Tribulus alatus* o tempo foi de quarenta dias, ou ainda, de acordo com o estudo de Fahim *et al.* (1982) que utilizou o ginseng coreano, o tempo suplementado foi de sessenta dias.

Na dosagem de testosterona sérica, por outro lado, os níveis pareciam decair com a suplementação, o que poderia sugerir que a análise de androgênios fecais avaliou outros metabólitos além da testosterona e que o estresse do sacrifício poderia também interferir nos dados finais.

Quando nossos dados de testosterona sérica e fecal foram comparados com os valores médios históricos do nosso laboratório, não foram observadas diferenças significativas entre os animais de 8 meses com animais de 90 dias. Isto poderia indicar que, mesmo em fase de declínio reprodutivo, os animais do presente estudo não estariam, ainda, com comprometimento da atividade esteroidogênica testicular e, portanto, ainda não apresentariam uma deficiência androgênica, o que em parte justificaria a falta de efeito estimulante do extrato da *Pfaffia glomerata* na síntese de androgênios.

Algo semelhante ocorreu com relação ao comportamento sexual em ratos tratados com *Pfaffia paniculata*, sendo que o efeito estimulante da mesma só foi observada em animais que já apresentavam tanto a libido como a frequência de ejaculação reduzidas, não tendo nenhum efeito sobre animais com comportamento reprodutivo normal (ARLETTI *et al.*, 1999). Assim como observado por com a síntese de testosterona comprometida o suficiente para

expressar uma melhora desses indicadores.

Do mesmo modo que os androgênios, os pesos absolutos e relativos de órgãos não diferiram estatisticamente entre os grupos tratados com o extrato da *Pfaffia glomerata* e o grupo controle. O método de pesagem de órgãos constitui uma ferramenta de estudo relativamente simples para avaliarmos uma possível ação trófica da testosterona em tecidos andrógeno-dependentes e/ou responsivos. O aumento de peso em órgãos relacionados diretamente com o metabolismo corporal (fígado e rins) também poderia indicar um possível efeito tóxico do extrato da planta (FREYBERGER e SHLADT, 2009), portanto a dose utilizada no presente estudo não apresentou toxicidade, ainda quando administrada numa dose de dez vezes maior que a recomendada.

Entretanto, quando a média do peso relativo dos testículos dos animais do grupo controle foi comparada com os dados históricos de animais de 90 dias (Quadro 1), observou-se uma redução significativa nos animais de 8 meses, assim como uma redução significativa no peso das vesículas seminais (0,13% contra 0,15%). Obviamente, o maior peso corporal dos animais de 8 meses, pode haver contribuído para esta redução, porém pode-se também inferir uma menor atividade destes órgãos, seja por uma menor estimulação hormonal e/ou responsividade dos mesmos aos hormônios circulantes. A redução do peso dos testículos pode indicar também uma menor atividade espermatogênica, como sugerido por Dalsenter *et al.* (1997), que demonstraram que reduções significativas no peso testicular são, em parte, decorrentes da menor produção espermática diária. De fato, quando analisamos os dados de produção espermática dos animais controle do presente estudo, encontramos uma redução de mais de 30 % no número médio de espermátides por testículo nos animais de oitos meses de idade ( $177,7 \times 10^6$ ) quando comparados com a média histórica dos animais de 90 dias ( $262,6 \times 10^6$ ). Esta redução na produção espermática poderia, em parte, justificar os menores índices reprodutivos dos animais de 8 meses no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Assim como para os androgênios, o tratamento com o extrato da *Pfaffia glomerata* não foi capaz de produzir nenhuma melhora no número médio de espermátides por testículos, já que nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos suplementados com *Pfaffia glomerata* e o grupo

controle. Infelizmente não temos nenhum dado prévio para comparar os nossos achados. Apesar do menor número de espermátides por testículo nos animais de 8 meses, a análise histológica do diâmetro de túbulos seminíferos, não revelou diferença significativa com os animais de 90 dias ( $P = 0,483$ ). Tampouco o tratamento com o extrato da *Pfaffia glomerata* foi capaz de modificar o valor médio do diâmetro dos túbulos seminíferos. O diâmetro do túbulo seminífero, bem como a altura do epitélio seminífero são utilizados, em conjunto com o total de espermátides, como indicadores da atividade espermatogênica, indicando que, no nosso estudo a suplementação com o extrato da *Pfaffia glomerata* não foi capaz de modificar a atividade espermatogênica de animais em declínio reprodutivo.

Na análise histológica para avaliar o diâmetro de túbulos seminíferos, os animais controle também não obtiveram média diferente dos animais suplementados da mesma forma que Martino-Andrade *et al.* (2010) não encontraram em animais de 90 dias.

Outra análise histológica realizada no presente estudo foi a mensuração do diâmetro de secção transversal das fibras musculares buscando avaliar uma possível resposta anabólica ao tratamento com o extrato de *Pfaffia glomerata*, devido a sua concentração de beta-ecdisterona (um provável componente anabólico que independeria dos níveis de testosterona). Entretanto, aparentemente a concentração de ecdisterona presente no extrato de *Pfaffia glomerata* por nós utilizado não foi suficiente para promover um anabolismo significativo na célula muscular, já que nenhuma diferença foi observada entre os animais controle e os animais dos grupos tratados. Embora ratos com 8 meses possam apresentar algum comprometimento endócrino-reprodutivo, Russ *et al.* (2011) sugerem que animais dessa idade ainda não possuem comprometimentos musculares como ratos idosos, sendo que apenas a partir dos vinte e quatro meses de vida o comprometimento muscular, como a perda de massa e da força musculare se tornam mais evidentes.

Outra possibilidade para a ausência de efeito anabólico do extrato da *Pfaffia glomerata* pode ser a reduzida atividade física dos animais do nosso estudo, já que em estudos anteriores a ecdisterona demonstrou possuir alguma atividade anabólica direta sobre as fibras musculares, porém, em sujeitos que praticavam exercícios físicos, concomitantes à suplementação. Tóth *et al.*

(2008) verificaram aumento do número de núcleos das células musculares, bem como aumento significativo do diâmetro das fibras musculares em ratos suplementados com beta-ecdisterona. No entanto, a dose máxima utilizada pelo autor foi de 5mg/kg de ecdisterona subcutânea e, tendo em vista que, segundo o laudo fornecido pelo fabricante, apenas 0,96% do extrato seco da *Pfaffia glomerata* utilizada em nosso estudo era composta por beta-ecdisterona, os ratos do presente estudo que receberam a maior dose (85mg/kg de *Pfaffia glomerata*), foram tratados com, no máximo, 0,85 mg/kg de ecdisterona. Esta dose relativamente baixa pode ter contribuído para a ausência do efeito anabólico do extrato da *Pfaffia glomerata*, quando comparada com as doses utilizadas em outros estudos, já que nas menores doses, Tóth *et al.* (2008) tampouco observaram efeito positivo da ecdisterona. É interessante, entretanto, ponderar que, mesmo não havendo diferença significativa na análise histológica muscular, não podemos descartar uma possível eficácia anabólica do extrato em animais e/ou humanos com comprometimento da função músculo-esquelética, principalmente se a suplementação for acompanhada de um programa regular de atividade física.

Finalmente, os dados do teste de Hershberger indicam que a utilização da fitoterapia com extrato da *Pfaffia glomerata* nas doses utilizadas no presente estudo sugerem a ausência de efeitos androgênicos diretos. Extrapolando-se para os seres humano esse achado sugere que, dependendo da dose, o uso de extratos da raiz de *Pfaffia glomerata* para quaisquer fins não estaria acompanhado do risco de virilização em mulheres, ou efeitos indesejáveis em homens, como uma possível hipertrofia prostática decorrente de ação androgênica direta. Do mesmo modo ficou evidenciado que o extrato de *Pfaffia glomerata* testado não tem efeito anti-androgênico direto, não interferindo, portanto, com as ações da testosterona endógena. Os dados do teste de Hershberger foram condizentes com os dados do experimento crônico. Estes achados, por sua vez, são muito importantes já que a aplicação medicinal da *Pfaffia glomerata* é ampla, podendo ser indicada para outros fins que não o de tônico reprodutivo (PINELLO *et al.*, 2006). Tal dado pode servir de suporte para a utilização da *Pfaffia glomerata* para outros fins assegurando ao usuário que não haverá o risco de virilização em mulheres ou efeitos indesejáveis como uma hipertrofia prostática em homens.

## 7. CONCLUSÃO

Considerando as condições descritas no presente experimento e os resultados aqui encontrados, pode-se concluir que o extrato de *Pfaffia glomerata*, nas doses utilizadas no presente estudo:

- 1) Não altera o peso de órgãos andrógeno-sensíveis em ratos machos adultos em fase de declínio reprodutivo em experimento crônico. A *Pfaffia glomerata* não altera os níveis de testosterona séricos e fecais em ratos machos adultos em fase de declínio reprodutivo;
- 2) Não altera o número de espermátides em ratos machos adultos em fase de declínio reprodutivo;
- 3) Não aumenta o diâmetro dos túbulos seminíferos em ratos machos adultos em fase de declínio reprodutivo;
- 4) Não aumenta o tamanho de fibras musculares em cortes de secção transversal em ratos machos adultos em fase de declínio reprodutivo.
- 5) Não tem ações androgênicas e/ou anti-androgênicas diretas em animais pré-púberes castrados.

Em conjunto, esses achados demonstram que o extrato de *Pfaffia glomerata* utilizado no presente estudo não apresenta efeitos estimulantes androgênicos e/ou anabólico muscular, nem tem ações androgênicas e/ou anti-androgênicas diretas em ratos.

## 8. REFERÊNCIAS

AMANN, R. P. et al. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 586-592, 1976.

ANDRADE JUNIOR, E. S. de.; CLAPAUCH, R.; BUKSMAN, S. Short term testosterone replacement therapy improves libido and body composition. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.56, n.8, p.996-1004, Nov 2009.

BAKER, P.J.; O'SHAUGHNESSY, P.J. Role of gonadotrophins in regulating numbers of leydig and sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. **Journals of Reproduction and Fertility**, n.122, p.227-234, Abril, 2001.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.771-

BIZEC LE, B. *et al.* Ecdysteroids: one potential new anabolic family in breeding animals. **Analytica Chimica Acta**, v. 473, p.89-97, Aug 2002.

BOMPA, T. O.; CORNACCHIA, L. J. **Treinamento de força consciente**. São Paulo: Phorte Editora, pg. 265, 2000.

BRAWER, M. K. Testosterone replacement in men with andropause: an overview. **Reviews in Urology**, v.6, n.6, p.S9-S15, 2004.

BREMNER, W. J.; VITIELLO, M. V.; PRINZ, P. N. Loss of circadian rhythmicity in blood testosterone levels with aging in normal men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.56, n.6, p.1278-1281, 1983.

BROWN, G. A. *et al.* Endocrine and lipid responses to chronic androstenediol-herbal supplementation in 30 to 58 year old men. **Journal of the American College of Nutrition**, v.20, n.5, p.520-528, 2001.

BROWN, J; WALKER, S. E.; STEINMAIN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species.** Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal. Virginia, EUA, 2004.

CARNEIRO, C. S. *et al.* *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) methanolic extract reduces angiogenesis in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.58, p.427–431, 2007.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L.C. **Histologia básica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p.123.

COLLINS, J. J. Salivary Hormone Testing: Science, Benefits, Limitations & Clinical Applications. **American Academy of Anti-Aging Medicine**, p.1-6, 2000.

COUTO, J. A. *et al.* Effect of chronic treatment with rosiglitazone on leydig cell steroidogenesis in rats: *In vivo* and *ex vivo* studies. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.8, n.13, Fevereiro 2010.

DALSENTER, P. R. *et al.* Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. **Human and Experimental Toxicology**, v. 16, p. 146-153, 1997.

DASGUPTA, A.; REYES, M.A. Effect of brazilian,indian, siberian, asian, and north american ginseng on serum digoxin measurement by immunoassays and binding of digoxin-like immunoreactive components of ginseng with fab fragment of antidigoxin antibody (gigibind). **American Journal of Clinical Pathology**, v.124, p.229-236, 2005.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicada na saúde.** 5 ed. São Paulo: Editora Robe, p.1303-1310. cap.81, 2002

ELLISON, P.T. *et al.* Population variation in age-related decline in male salivary testosterone. **Human Reproduction**, v.17, n.12, p.3251-3253, 2002.

EL-TANTAWY, W. H.; TEMRAZ, A.; EL-GINDI, A.D. Free Serum Testosterone Level in Male Rats Treated with Tribulus Alatus Extracts. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, n.4, p.554-559, Agosto, 2007.

FIGUEIROA, M.S. *et al.* Green tea polyphenols inhibit testosterone production in rat Leydig cells. **Asian Journal of Andrology**, v.11, p.362-370, 2009.

FLORES, R. *et al.* Análise de beta-ecdisona em plantas *in vivo* e *in vitro* de *pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen, através da cromatografia em camada delgada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.368-371, Março, 2009.

FLORES, R. *et al.* Extração de ecdisterona em raízes de ginseng brasileiro. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1223-1226, Julho 2009.

FOSTER, P. M. D. Testicular organization and biochemical function. In: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of male reproduction**, San Diego: Academic Press, p.7-34, 1988.

FOX, S.I. **Fisiologia humana**. 7.ed. Barueri: Manole, p. 647-648, 2007.

FRANK, A. A. **Nutrição no envelhecer**. São Paulo: Editora Atheneu, p.18-189, 2002.

FREYBERGER, A. E SHLADT, L. Evaluation of rodent Hershberger bioassay on intact juvenile males- Testing of coded chemicals and supplementary biochemical investigations. **Toxicology**, v.262, p.114-120, 2009.

GAO, L.; CAI, G.; SHI, X. B-Ecdysterone induces osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells and relieves osteoporosis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.12, p.2245-2249, Dezembro 2008.

GARRETT JUNIOR, W.E.; KIRKENDALL, D.T.; **A ciência do exercício e dos esportes**. Porto Alegre: Editora Artmed, p.177, 2003.

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

GOMELLA, L. G. Effective testosterone suppression for prostate cancer: is there a best castration therapy? **Reviews in Urology**, v.11, n.2, p.52-60, 2009.

GOSMANN, G. *et al.* Botanical (morphological, micrographic), chemical and pharmacological characteristics of *pfaffia* species (amaranthaceae) native to south Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.2, p.141-147, Jun 2003.

GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.85-93, Jul-Dez 2002.

GRIFFIN, D. K. *et al.* Transcriptional profiling of luteinizing hormone receptor-deficient mice before and after testosterone treatment provides insight into the hormonal control of postnatal testicular development and leydig cell differentiation. **The Society for the Study of Reproduction**, p.1-21, Fevereiro, 2010.

HARMAN, S. M. *et al.* Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n.2, p.724-731, Outubro, 2000.

HERBST, K. L. *et al.* Testosterone administration to men increases hepatic lipase activity and decreases HDL and LDL size in 3 wk. **The American**

**Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.284, p.E1112-E1118, Junho, 2003.

HIRSHFIELD, A.N.; FLAWS, J. A. Reproductive senescence, nonhuman mammals. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 2006. P.243.

KANEMATSU, N. Age-related changes of reproductive hormones in young meishan boars. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.5, p.651-656, Jul 2006.

KATCH, F.I.; KATCH, V.L.; MCARDLE, W.D. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho Humano**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.440, 2008.

KAUFMAN, J. M.; VERMEULEN, A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical therapeutic implications. **Endocrine Reviews**, v.26, n.6, p.833-876, Maio, 2005.

KIZELSZTEIN, P. *et al.* 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. **The American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.296, p.433-439, Janeiro, 2009.

KOEVA, Y. *et al.* Age-related changes in the expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat Leydig cells. **Polish Histochemical et Cytochemical Society**, v.47, n.2, p.281-287, Março, 2009.

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **Journal of Insect Science**, v.3, n.7, p.1-30, Mar 2003.

LIU, P. Y. *et al.* The short-term effects of high-dose testosterone on sleep, breathing, and function in older men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, n.8, p.3605-3613, 2003.

LYNCH, G.S.; SCHERTZER, J.D.; RYALL, J.G. Therapeutic approaches for muscle wasting disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113, p.461–487, 2007.

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.2010, p.165–170, 2010.

MARTINS, A. M.; COSTA, E. M. F. Benefícios e riscos do tratamento da andropausa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.51, n.2, p.61-74, 2005.

MONTANARI-JUNIOR. Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen visando seu cultivo comercial. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-Tropical). Capinas, 2005.

MOON, H-J.; KANG, T.S.; KIM, T.S.; KANG, I.H.; KIM, S.H. E HAN, S.Y. OECD validation of phase-3 Hershberger assay using the stimulated weanling male rat in Korea. **Journal of Applied Toxicology**, v.30, p.361-368, Janeiro, 2010.

MOUNDIPA, P.F. *et al.* Effects of *Basella alba* and *Hibiscus macranthus* extracts on testosterone production of adult rat an bull Leydig cells. **Asian Journal of Andrology**, v.7, n.4, p.411-417, 2005.

MYERS, J. B.; MEACHAM, R. B. Androgen replacement therapy in the aging male. **Reviews in Urology**, v.5, n.4, p.216-226, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: principios de bioquímica**. 4 ed. São Paulo, Sarvier, p.358, 2006.

NETO, A.G. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.87-91, 2005.

OECD. Report of The First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Working Group, 10th-11th, Paris, March 1998.

OSHIMA, M.; GU, Y. *Pfaffia paniculata*-induced changes in plasma estradiol-17beta, progesterone and testosterone levels in mice. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, n.2, p.175-180, 2003.

OWENS, et al. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. **Environmental health perspectives**, v.114, n.8. Agosto, 2006.

PAGE, S. T. *et al.* Exogenous testosterone (T) alone or with finasteride increases physical performance, grip strength, and lean body mass in older men with low serum T. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, n.3, p.1502-1510, Março, 2005.

PINELLO, K. C. *et al.* Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. **Life Sciences**, v.78, p.1287-1292, 2006.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 5 ed. Barueri: Manole, p.85, 2005

QUEIROGA, L. C. Atividade antiinflamatória de saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Sociedade Brasileira de Química**, 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Maio 2008.

RAJENDAR, B. *et al.* Protective effect of an aphrodisiac herb *tribulus terrestris* linn on cadmium-induced testicular damage. **Indian Journal of Pharmacology**, v.43, n.5, p.568-573, Setembro 2011.

RHOADES, R.A.; TANNER, G.A. **Medical physiology**. Baltimore: Lippincott Williams e Wilkins, 1995. p.750.

SAAD, F. The role of testosterone in type 2 diabetes and metabolic syndrome in men. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.8, p.901-907, Outubro, 2009.

SANCHES, N.R. *et al.* Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p.613-617, 2001.

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

SILVA da, T. C. *et al.* Inhibitory effects of *pfaffia paniculata* (brazilian ginseng) on preneoplastic and neoplastic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model. **Cancer Letters**, v.226, p.107-113, 2005.

SON, B. *et al.* Androgen receptor-dependent transactivation of growth arrest-specific gene 6 mediates inhibitory effects of testosterone on vascular calcification. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.10, p.7537-7544, Março, 2010.

SWERDLOFF, R. S. *et al.* Suppression of spermatogenesis in man induced by nal-glu gonadotropin releasing hormone antagonist and testosterone enanthate (TE) is maintained by TE alone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.83, n.10, p.3527-3533, 1998.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1046: 54 – 74, 2005.

TÓTH, N. *et al.* 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. **Phytomedicine**, v.15, p.691–698, 2008.

VALLE, A. *et al.* The sérum levels of  $17\beta$ -estradiol, progesterone and triiodothyronine correlate with brown adipose tissue thermogenic parameters during aging. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.22, p.337-346, Maio 2008.

VIGO, C.L.S. *et al.* Caracterização farmacognóstica comparativa de *pfaffia glomerata* (spreng.) pedersen e *hebanthae paniculata martius* – amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.7-19, 2004.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *pfaffia glomerata* (Spreng.) pedersen – amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl.2, p.46-49, 2003.

WILBORN, C. D. *et al.* Effects of methoxyisoflavone, ecdysterone, and sulfo-polysaccharide supplementation on training adaptations in resistance-trained males. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.3, n.2, p.19-27, 2006.

WINDAHL, S. H. *et al.* Reduced bone mass and muscle strength in male  $5\alpha$ -reductase type 1 inactivated mice. **Plos One**, v.6, n.6, Junho 2011.