

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DO
EXTRATO SECO DE *Tribulus terrestris* SOBRE O DANO
INDUZIDO POR CICLOFOSFAMIDA NO SISTEMA
REPRODUTOR MASCULINO DE CAMUNDONGOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natasha Frasson Pavin

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

NATASHA FRASSON PAVIN

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DO EXTRATO SECO DE *Tribulus terrestris* SOBRE O DANO INDUZIDO POR CICLOFOSFAMIDA NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos
Cibin

Uruguaiiana

2016

NATASHA FRASSON PAVIN

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DO EXTRATO SECO DE *Tribulus terrestris* SOBRE O DANO INDUZIDO POR CICLOFOSFAMIDA NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em 02 de Abril de 2016.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos Cibir
Orientadora
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Ricardo Brandão
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Simone NoreMBERG Kunz
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Dedico esta dissertação aos meus filhos, Paulo Roberto e João Francisco, meu amor incondicional sempre será de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por todas as oportunidades e pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho, sempre me guiando e me protegendo, me dando tranquilidade e sabedoria para que fosse possível a realização deste sonho.

Gostaria de agradecer imensamente a minha família: mãe, pai, sogra, sogro, irmãs, Léo e Ciça meus alicerces, que foram indispensáveis e incansáveis para que este mestrado tenha dado certo, me ajudando de diversas formas, mas principalmente com o Paulo Roberto, levando, buscando, cuidando... Enfim, só tenho a agradecer a cada um de vocês por serem tão especiais e que através deste carinho me mostraram que jamais deveria desistir, vocês são tudo para mim! Amo muito cada um!

Meu marido, amigo, companheiro e eterno namorado, Paulinho. Simplesmente não tenho palavras para descrever, tu foste essencial neste caminho! A pessoa que mais me deu apoio, força e animo durante esses dois anos! Entendeu minhas ausências, meus dias de exaustão, “tapou” meus furos quando não poderia estar presente, enfim, tu foste além de qualquer expectativa! Me ajudou tanto, mas tanto, que talvez nem tu mesmo saiba disso! Poderia ficar horas escrevendo, “rasgando uma seda”, mas as palavras ainda seriam poucas, diante de tudo o que fizeste (não preciso nem mencionar, relacionado ao PR). Te amo muito! Muito obrigada por estar comigo em todas as horas!

A minha mãe científica, orientadora e amiga, Fran! Mulher e profissional íntegra, de caráter, personalidade forte e doce ao mesmo tempo, não conseguirei jamais resumir o quanto sou grata pela oportunidade a mim dada de fazer parte do teu grupo de pesquisa, levarei sempre comigo todos os teus ensinamentos (com aquela velha frase: “Leva isso para a tua vida...”). Tu foste essencial neste percurso, e espero sempre te ter por perto, pois tu te tornaste uma pessoa extremamente especial em minha vida! Muito obrigada por tudo!

A família Biotech, vocês foram um máximo! Fizeram com que tudo ficasse mais leve, mais fácil e menos cansativo, sentirei saudades dos nossos dias no laboratório, das risadas, dos momentos em que estava em “Nárnia” e perdia algum assunto e vocês me atualizavam, hehe! Vocês me ensinaram muito! Obrigada pela disposição, por repetir várias vezes à mesma explicação de protocolos, pelas “indiadas”, enfim, não é por acaso que nos denominamos “família”, Muito obrigada a cada um de vocês!

Ao Biotech área limpa, muito obrigada pelas colaborações, por estarem sempre disponíveis em me ajudar, a tirar as dúvidas quando elas apareciam, por participarem de todas as pesquisas propostas, por estarem sempre “presentes” quando era necessário. Muito obrigada!

A todos que de uma forma colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Fundação Universidade Federal do Pampa

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DO EXTRATO SECO DE *Tribulus terrestris* SOBRE O DANO INDUZIDO POR CICLOFOSFAMIDA NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CAMUNDONGOS.

AUTOR: Natasha Frasson Pavin

ORIENTADORA: Francielli Weber Santos Cibin

Data e Local da Defesa: Uruguiana, 02 de abril de 2016

A ciclofosfamida (CP) é um agente antineoplásico e imunossupressor. É uma droga utilizada no tratamento de diversos tipos de tumores, usada para evitar a rejeição em transplante de órgãos e em doenças autoimunes, como artrite reumática e lúpus eritematoso. A CP é um pró-fármaco que sofre biotransformação no fígado pelo citocromo P450 para gerar metabólitos ativos como a mostarda fosfaramida e a acroleína. Seus metabólitos podem ocasionar um quadro de estresse oxidativo causando danos a diversos órgãos, entre eles o sistema reprodutor. A *Tribulus terrestris* (TT) faz parte da família das Zygophyllaceae, é uma erva rasteira perene com uma distribuição generalizada no Mediterrâneo, climas subtropicais e no deserto de todo o mundo. Na medicina popular tradicional, tem sido utilizada desde a antiguidade como um afrodisíaco, para energizar, vitalizar e melhorar a função sexual e desempenho físico em homens, bem como para tratar infecções urinárias, inflamações, edemas e outras doenças. Apesar de estudos experimentais e clínicos confirmarem parcialmente o fato de alguns efeitos da TT sobre a libido e a produção de esperma estarem envolvidos com o componente majoritário desta planta, a protodioscina, ainda há muito debate a respeito dos possíveis mecanismos de ação, bem como da sua aplicação terapêutica. Considerando o potencial antioxidante e esteroideogênico da TT, este estudo possui como objetivo investigar o potencial protetor do extrato seco da TT contra o dano testicular induzido pela ciclofosfamida em camundongos machos. Os camundongos Swiss machos receberam o extrato seco de TT como pré-tratamento por gavagem, durante 14 dias, na dose de 11 mg/Kg. No 14^o dia, receberam uma única injeção intraperitoneal de ciclofosfamida na dose de 100 mg/Kg. Após 24 horas, esses animais foram anestesiados e eutanasiados, e o sangue, os testículos e os epidídimos foram retirados para posteriores análises bioquímicas, avaliação espermática e histopatológica. A presença e quantificação de protodioscina no

extrato de TT foram avaliadas por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), onde foi verificada uma concentração de 1,48% no extrato seco. A CP causou um desequilíbrio no sistema reprodutor destes animais, através do aumento das espécies reativas (ER), peroxidação lipídica (TBARS) e carbonilação de proteínas, bem como uma alteração nas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reductase (GR). O pré tratamento com TT foi eficaz em proteger contra esses danos. Além disso, foi verificado uma redução na atividade da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD), corroborando com a redução do nível de testosterona sérica verificado neste trabalho. Ao mesmo tempo, ao analisarmos a histopatologia dos testículos destes animais, verificamos uma moderada desorganização do epitélio espermatogênico, bem como, uma congestão dos vasos sanguíneos intersticiais. Estes achados corroboraram com os resultados encontrados na avaliação seminal dos animais tratados com CP, onde foi possível verificar uma diminuição da motilidade (41,07%), do vigor (23,52%), da integridade de membrana (43,44%) e da velocidade curvo-retilínea (25,43%), e o pré tratamento com TT foi eficaz em proteger contra esses danos. Em conclusão, este trabalho visou demonstrar pela primeira vez o potencial protetor do extrato seco de TT contra os danos ao sistema reprodutor masculino de camundongos expostos ao quimioterápico CP. A melhora dos parâmetros avaliados pode estar relacionada ao potencial antioxidante e esteroidogênico, bem como pela quantidade de protodioscina observada neste extrato.

Palavras-chave: ciclofosfamida; *tribulus terrestris*, protodioscina; sistema reprodutor masculino.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

**ASSESSMENT OF THE POTENTIAL PROTECTOR EFFECT OF *Tribulus terrestris*
DRY EXTRACT ON CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED DAMAGE TO MALE
MICE REPRODUCTIVE SYSTEM.**

AUTHOR: NATASHA FRASSON PAVIN

ADVISOR: FRANCIELLI WEBER SANTOR CIBIN

Date and Place of Defense: Uruguaiana, april 2nd, 2016

Cyclophosphamide (CP) is an antineoplastic and immunosuppressive agent. It is a drug used to treat various tumours types, and also to prevent rejection in organ transplantation and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus. The CP is a prodrug which is biotransformed in the liver by cytochrome P450 enzymes to generate active metabolites phosphoramidate mustard and acrolein. Its metabolites can cause oxidative stress state, leading to damage in various organs, including the reproductive system. *Tribulus terrestris* (TT) is part of the family of Zygophyllaceae, it is a perennial creeping herb with a widespread distribution in the Mediterranean, subtropical climates and desert around the world. In traditional folk medicine, it has been used since ancient times as an aphrodisiac, to energize, vitalize and improve sexual function and physical performance in men and to treat urinary infections, inflammation, edema and other diseases. Although experimental and clinical studies partly confirm that some effects of TT on libido and sperm production are involved with the major component of this plant, protodioscin, there is still much debate about the possible mechanisms of action, as well as their therapeutic application. Considering the antioxidant and steroidogenic potential of TT, this study has the objective of investigating the protective potential of TT dry extract against testicular damage induced by cyclophosphamide in male mice. The male Swiss mice received the TT dry extract as pretreatment by gavage for 14 days at a dose of 11 mg kg⁻¹. On day 14, animals received a single intraperitoneally injection of cyclophosphamide at a dose of 100 mg kg⁻¹. After 24 hours, the animals were anesthetized and euthanized, and blood, testes and epididymis were removed for further biochemical analyzes, sperm and histological evaluation. The presence and quantification of protodioscin in TT extract were analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography), where a concentration of 1.48% of dry extract was verified. CP caused an imbalance in the reproductive system of these animals by increasing the reactive species (RS),

lipid peroxidation (TBARS) and protein carbonylation, as well as change in antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR). The pre-treatment with TT was effective in protecting against this damage. Furthermore, a reduction in the activity of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) was found, confirming the reduction of serum testosterone levels observed in this study. Additionally, when analyzing the histopathology of the animals' testes, we perceived a moderate disruption of spermatogenesis epithelium, as well as a congestion of interstitial blood vessels. These findings corroborate the results found in seminal evaluation of the animals treated with CP, where we observed a decrease in motility (41.07%), vigor (23.52%), membrane integrity (43,44%) and curved-straight speed (25.43%), and the pre-treatment with TT was effective in protecting against this damage. In conclusion, this study aimed to demonstrate for the first time the protective potential of TT dry extract against damage to the male reproductive system of mice exposed to CP chemotherapy. Improvement of these parameters may be related to antioxidant and steroidogenic potential as well as the amount of protodioscin observed in this extract.

Key-words: cyclophosphamide; *tribulus terrestris*, protodioscin; male reproductive system

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Estrutura química da Ciclofosfamida.....	16
Figura 2. Estrutura química da protodioscina.....	20
Figura 3. Correlação do hormônio Dehidroepiandrosterona-Sulfato (DHEA-S) com os níveis de testosterona sérica.....	21

Artigo

Figure 1. HPLC analysis of protodioscin.....	45
Figure 2. Effect of CP (100 mg kg ⁻¹) and the dry extract of TT pre-treatment (11 mg kg ⁻¹) on 17 β-HSD activity in testes.....	46
Figure 3. . Effect of CP (100 mg kg ⁻¹) and the dry extract of TT pre-treatment (11 mg kg ⁻¹) on serum testosterone (T) concentrations.....	46
Figure 4. Photomicrograph of seminiferous tubules from mices in control group.....	47
Figure 5. Photomicrograph of seminiferous tubules from mices treated with CP.....	47
Figure 6. 6 Correlation of hormone-dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S) with the levels of testosterone.....	48

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1. Effect of CP (100 mg kg ⁻¹) and the dry extract of TT pre-treatment (11 mg kg ⁻¹) on Biochemical assay.....	49
Table 2. Effect of CP (100 mg kg ⁻¹) and the dry extract of TT pre-treatment (11 mg kg ⁻¹) on epididymal sperm characteristics.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT - Catalase
 CDNB - 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
 CP – Ciclofosfamida
 DIC - Carboxifluoresceína diacetato
 DCHF-DA – 2',7'- diclofluoresceína diacetato (do ingles, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate)
 DNA - Ácido desoxirribonucleico
 DNPH - Dinitrofenilhidrazina
 DHEA – Dehidroepiandrosterona
 ER – Espécies reativas
 GPx - Glutaciona peroxidase
 GSSG - Glutaciona dissulfeto
 GSH - Glutaciona reduzida
 GST - Glutaciona S-transferase
 GR – Glutaciona redutase
 H₂O - Água
 H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
 HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High performance liquid chromatography)
 I.P – Intraperitoneal
 MDA - Malondialdeído
 NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
 NO – Óxido nítrico
 O₂ - Oxigênio molecular
 O₂^{•-} - Ânion superóxido
 OH[•] - Radical hidroxila
 ONOO⁻ - Peroxinitrito
 PI - Iodeto de propídeo
 PTN – Protodioscina
 SCA – Analisador de espermatozoides (do inglês, Sperm Class Analyzer)
 SOD - Superóxido dismutase
 TBA – Ácido tiobarbitúrico
 TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, thiobarbituric acid reactive species)
 T - Testosterona
 TT – *Tribulus terrestris*
 UV - Ultravioleta
 VCL – Velocidade Curva Retilínea (do inglês, curvilinear velocity)
 17β-HSD - 17β-hidroxiesteróide desidrogenase

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Ciclofosfamida.....	16
3.2 Ciclofosfamida e o Sistema Reprodutor.....	17
3.3 Estresse Oxidativo.....	18
3.4 <i>Tribulus terrestris</i>	19
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
5 CONCLUSÕES.....	51
6 PERSPECTIVAS.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados.....	57
ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA – UNIPAMPA.....	58
ANEXO B – Carta de submissão do artigo.....	59

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da incidência de câncer e de doenças imunes, a ciência compete na produção de novas drogas que tentem eliminar ou reduzir a gravidade das lesões ocasionadas por estas doenças. Um dos medicamentos mais importantes e amplamente utilizados no passado e até o presente momento é a ciclofosfamida (CP).

A CP é amplamente utilizada no tratamento de múltiplas formas de câncer e de doenças autoimunes em adulto e crianças (Haubitz, Bohnenstengel et al. 2002, Jalali, Hasanzadeh et al. 2012), é um agente alquilante pertencente à classe de oxazafosforinas, onde é rapidamente metabolizada no fígado, pelo citocromo P-450 para gerar metabolitos ativos alquilantes, tais como 4-hidroxíciclofosfamida, mostarda fosfaramida e acroleína. Estes por sua vez têm como função interferir na síntese do DNA de células que se dividem rapidamente e como última etapa, induzir a apoptose (Crook, Souhami et al. 1986, Hemminki and Kallama 1986).

Apesar da sua ampla utilização, o uso de CP é limitado, pois como um dos efeitos colaterais relacionados ao seu uso, podemos ressaltar a sua alta toxicidade (Chakraborty, Sk et al. 2009) e dentre essas toxicidades podemos destacar a toxicidade reprodutiva.

Alguns estudos demonstraram que os pacientes do sexo masculino com câncer tratados com CP apresentaram um aumento da incidência de oligospermia e azoospermia (Charak, Gupta et al. 1990, Kenney, Laufer et al. 2001), além disso, podem apresentar um distúrbio na secreção de gonadotrofinas associado a uma redução dos níveis de testosterona sérica (Hoorweg-Nijman, Delemarre-van de Waal et al. 1992) e a reversão da fertilidade é imprevisível nesses pacientes tratados com o fármaco.

A busca por novas alternativas terapêuticas para minimizar esses efeitos tóxicos ocasionados pelos quimioterápicos é muito intensa, desta forma, podemos destacar o uso de compostos naturais, que possuem uma alta atividade antioxidante e baixa toxicidade como uma forma de prevenção ou reversão aos danos ocasionados.

A *Tribulus terrestris* (TT) é uma erva rasteira, perene, nativa da região mediterrânea, amplamente distribuída em áreas subtropicais (Al-Rawi 1985). A planta é utilizada na medicina popular na China, onde seus frutos são denominados de " Ji Li " e são usados para tratar a inflamação ocular, a irritação da pele, a pressão arterial elevada, distensão abdominal e doenças cardiovasculares (Gauthaman, Adaikan et al. 2002, Kostova and

Dinchev 2005, Akram, Asif et al. 2011). Popularmente a TT é conhecida por melhorar o desempenho muscular de atletas, bem como por acentuar o desempenho sexual de homens.

Tomova, Gjulemetova et al. (1981) evidenciaram que a administração da TT em seres humanos e animais melhoram a libido e a espermatogênese. Acredita-se que esta melhora é devido a um dos principais componentes presentes na TT, a protodioscina (PTN), uma saponina esteroidal, devido a sua ação hormonal, através do aumento dos níveis de hormônio luteinizante, testosterona sérica, e de seus precursores (dihidrotestosterona e diidrotestosterona-sulfato), (Gauthaman, Adaikan et al. 2002, Gauthaman, Ganesan et al. 2003).

Considerando os efeitos tóxicos ocasionados no sistema reprodutor masculino de usuários da CP e que seu uso ainda causa bastante dúvida, pois a infertilidade tem um papel crítico e um impacto tanto físico como emocional na decisão do uso deste medicamento, a utilização de um composto natural com potencial antioxidante e esteroideogênico poderia ser uma alternativa para tentar auxiliar na prevenção da toxicidade induzida pela CP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esse trabalho propõe avaliar a toxicidade de uma única dose de ciclofosfamida (100mg/kg) sobre o sistema reprodutor masculino (testículos e epidídimos) de camundongos, e testar uma terapia natural com potencial antioxidante e esteroidogênico (extrato seco da TT) que possa prevenir esse dano induzido pelo quimioterápico.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito de uma única administração de CP bem como o papel protetor do extrato seco de TT sobre:

- Quantificar o principal constituinte do extrato seco de TT, a protodiocina por HPLC (High-performance liquid chromatography).
- O dano oxidativo em membranas lipídicas (TBARS) e proteínas (carbonilação de proteínas) bem como os níveis de espécies reativas (ER) nos testículos dos camundongos;
- A atividade das principais enzimas antioxidantes nos testículos dos animais tratados como: a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathiona-S-transferase (GST);
- Avaliação histopatológica dos testículos;
- Verificar a qualidade do sêmen dos animais;
- A atividade da enzima 17 β -HSD no tecido testicular, responsável pela conversão da androstenodiona em testosterona;
- Os níveis plasmáticos de testosterona;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

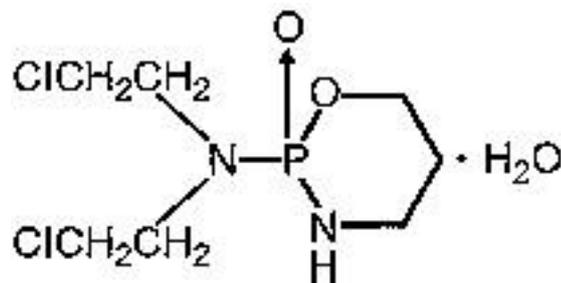
3.1 Ciclofosfamida

A Ciclofosfamida (CP) é um agente alquilante citotóxico utilizado na quimioterapia para tratamento de doenças linfoproliferativas, alguns tumores sólidos e em doenças não neoplásicas, como síndrome nefrótica, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (Tripathi and Jena 2009).

Este quimioterápico é administrado pela via oral ou via intravenosa, em uma ampla faixa de dosagem (de Jonge, Huitema et al. 2005). Ela é facilmente absorvida via oral, amplamente distribuída pelo organismo e apresenta um baixo grau de ligação às proteínas plasmáticas, aproximadamente 20% (Boddy and Yule 2000). A dose, o tempo e a via de administração são geralmente determinados pelo tipo de patologia. A dose da CP usada nos tratamentos de doenças neoplásicas pode variar, dependendo do regime terapêutico a ser adotado. Esta faixa de dosagem em humanos varia de 2-6 mg/Kg (baixa dose) a >6000 mg/m² (alta dose)(de Jonge, Huitema et al. 2005).

A CP é inativa *in vitro* (figura 1), para que ela se transforme na sua forma ativa, ela necessita ser biotransformada no tecido hepático pelas enzimas do complexo P-450. Como um agente alquilante, a CP reage com as bases de DNA, produzindo uma ligação cruzada entre os filamentos de DNA, assim a menos que haja uma reparação, as células não terão uma réplica efetiva (Colvin and Hilton 1981). Este mecanismo responde tanto pelos efeitos farmacológicos quanto pelos efeitos tóxicos ocasionados pelo uso deste quimioterápico.

Figura 1: Estrutura química da Ciclofosfamida



Fonte: Modificado de Silvis (2005)

Dentre os metabólitos ativos formados após a metabolização da CP a mostarda fosforamida e a acroleína são um dos mais importantes, pois os efeitos antitumorais da CP estão associados diretamente à mostarda fosforamida, ao passo de que a acroleína é ligada aos efeitos colaterais tóxicos, como a morte celular, apoptose e necrose (Kern and Kehrer 2002).

3.2 Ciclofosfamida e o sistema reprodutor

Apesar da sua importância terapêutica, uma vasta gama de efeitos adversos incluindo toxicidade reprodutiva foi demonstrada após o tratamento com CP em seres humanos e em animais experimentais (Anderson, Bishop et al. 1995). Pacientes adultos do sexo masculino, tratados com CP apresentaram uma contagem diminuída de espermatozoides e uma ausência de ciclos de espermatogênese em seu tecido testicular (Charak, Gupta et al. 1990, Howell and Shalet 1998, Kenney, Laufer et al. 2001), além disso, também foi observado um distúrbio na secreção de gonadotrofina, associado juntamente a uma diminuição dos níveis de testosterona sérica (Hoorweg-Nijman, Delemarre-van de Waal et al. 1992).

Estudos anteriores em ratos machos têm confirmado o potencial da CP em causar oligospermia, azoospermia e alterações histológicas nos testículos e epidídimos (Meistrich, Parchuri et al. 1995, Kaur, Sangha et al. 1997). Além disso, Elangovan, Chiou et al. (2006), avaliou o efeito toxicológico da CP sobre o sistema reprodutor de camundongos expostos a diferentes doses de CP intraperitoneal (I.P) (5 – 200mg/Kg) e seus resultados demonstraram que mesmo em baixas doses, a CP ocasionou uma diminuição no peso do órgão reprodutivo (testículos), bem como uma diminuição na fertilidade e alterações no crescimento e desenvolvimento das próximas gerações. Porém, após a 5ª semana de exposição ao quimioterápico, os animais testados com a dose mais baixa, apresentaram uma tendência a recuperação na espermatogênese quando comparados ao grupo tratado com altas doses de CP.

Matsui, Mitsumori et al. (1995) demonstraram através de um estudo morfométrico de diferentes fases do ciclo da espermatogênese, que a toxicidade testicular depois de uma única administração oral de ciclofosfamida (100 mg/Kg) em ratos, é possível ser detectada a partir do sétimo dia após sua administração.

Embora o(s) mecanismo(s) preciso(s) pelo qual a CP causa toxicidade testicular não tenha sido totalmente elucidado, vários estudos demonstraram que a exposição à CP pode perturbar o equilíbrio redox de tecidos, desta forma conduzindo-os ao estresse oxidativo (Das, Mallick et al. 2002, Ghosh, Das et al. 2002, Manda and Bhatia 2003).

3.3 Estresse Oxidativo

As espécies reativas (ER) são capazes de gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e reação com os constituintes celulares (Josephy 1997, Timbrell 2000). Estas são geradas por uma variedade de processos, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo, tais como DNA, lipídeos e proteínas.

Quando um elétron encontra-se sozinho em um orbital atômico, ele é dito desemparelhado. Espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência são chamadas de radicais livres e geralmente são altamente reativas (Halliwell and Gutteridge 1990). Nos organismos aeróbios isso geralmente ocorre com a redução de uma molécula de oxigênio (O_2) a ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Visto que esta é uma reação de óxido-redução, é importante ressaltar que a formação do ânion superóxido e outros radicais livres em seres vivos ocorrem principalmente onde há alto fluxo de elétrons como, por exemplo, na mitocôndria, onde os elétrons podem passar diretamente dos transportadores de elétrons para o oxigênio durante a cadeia respiratória (Halliwell 1991).

As principais ER vinculadas ao estresse oxidativo são: o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). Estes por sua vez são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído de enzimas tais como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx), além de inúmeros sistemas de defesas não enzimáticas incluindo as vitaminas A, E e C, flavanóides, ubiquinonas e o conteúdo de glutathiona reduzida (Alexi, Hughes et al. 1998, Gianni, Kaczor et al. 2004). Neste contexto o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de ER quanto da redução da capacidade antioxidante celular total (Halliwell 1991).

As ER têm sido atribuídas à patogênese de diversas condições que afetam praticamente todos os sistemas do corpo humano, entre elas está aterosclerose, câncer, diabetes, dano hepático, artrite reumatoide, catarata, AIDS, doença inflamatória intestinal, distúrbios do sistema nervoso, doença de Parkinson, doenças neuromotoras, e condições associadas com o nascimento prematuro (Agarwal, Nallella et al. 2004). Além disso, o estresse oxidativo tem sido extremamente associado com a infertilidade masculina (Makker, Agarwal et al. 2009, Bansal and Bilaspuri 2010), pois os espermatozoides são mais suscetíveis à produção de ER por causa da alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e pela sua baixa capacidade antioxidante (Vernet, Aitken et al. 2004). Um desequilíbrio na

produção de ER e defesas antioxidantes durante o processo de divisão celular do sistema reprodutor masculino, pode reduzir a produção e a qualidade dos espermatozoides, resultando em infertilidade (Borgmann, Haubitz et al. 2002).

Desta forma, como já foi mencionado, para que a atividade terapêutica da CP se torne efetiva, ela deve sofrer uma biotransformação no tecido hepático, desta forma, gerando alguns metabólitos ativos, e um dos seus metabólitos, a acroleína, é a principal responsável por induzir o estresse oxidativo, através da ativação de ER e produção de óxido nítrico, danificando o DNA, lipídios e proteínas de células normais, podendo ocasionar morte celular, apoptose e necrose (Kern and Kehrer 2002, Korkmaz, Topal et al. 2007).

Embora os testículos expressem várias enzimas antioxidantes, eles são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo. Já foi bem estabelecido que o estresse oxidativo testicular é comumente induzido sob diferentes condições normais e/ou patofisiológicas, podendo levar a infertilidade masculina (Siu, Mruk et al. 2009). Diversas evidências sugerem o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de várias doenças, atraindo a atenção dos cientistas e público em geral para o papel dos antioxidantes na manutenção e prevenção da saúde bem como no tratamento de doenças.

Através deste ponto de vista, os compostos naturais, que possuem potencial antioxidante, estão sendo de grande interesse da comunidade científica, por serem substâncias, compostos ou alimentos que podem ser utilizados como terapia ou prevenção de diversas doenças, desta forma, se tornando uma nova alternativa frente aos diferentes distúrbios que atualmente acometem a humanidade.

3.4 *Tribulus terrestris*

A *Tribulus terrestris* L. (TT) é um membro da família Zygophyllaceae, é uma erva rasteira, anual de aproximadamente 30-70 cm de altura que possui suas folhas pinadas (de comprimento desigual), flores amarelas e seus frutos na forma de estrela no seu carpelo. É uma planta amplamente distribuída em climas subtropicais, na África, Ásia ocidental, China, Japão, Coreia e Europa (Al-Rawi 1985).

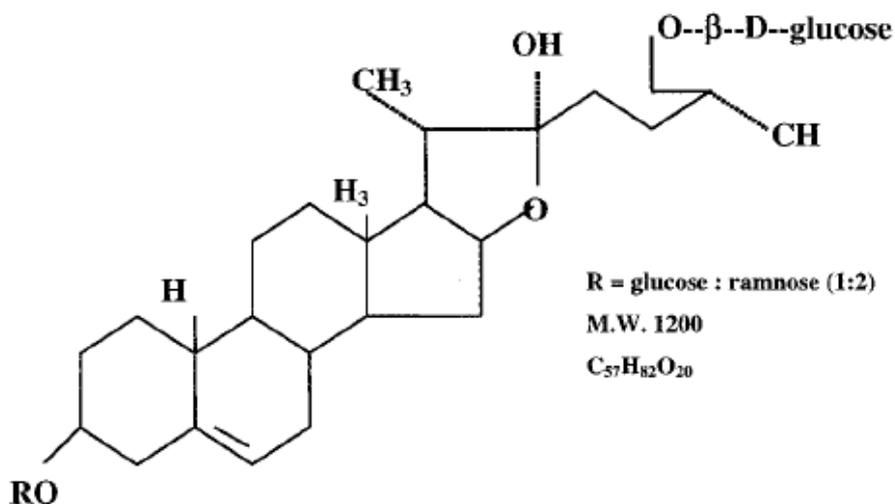
O extrato desta planta proveniente do fruto, tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de uma variedade de doenças, incluindo a hipertensão, doenças do sistema urinário, doença cardíaca coronária, inflamação ocular e infertilidade em ambos os sexos (Wang, Ma et al. 1990, Anand, Patnaik et al. 1994, Akram, Asif et al. 2011).

O potencial terapêutico desta planta parece estar relacionado com o seu potencial antioxidante e esteroideogênico. Em um estudo realizado por Amin, Lotfy et al. (2006), foi observado que a utilização do extrato completo da TT mostrou uma atividade antioxidante e exerceu um efeito protetor em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, os autores acreditam que este efeito ocorreu através da inibição do estresse oxidativo (diminuindo significativamente os níveis de MDA do fígado) além disso, a histopatologia do fígado dos animais diabéticos que utilizaram a TT revelou uma significativa recuperação deste órgão comparado ao grupo controle.

Corroborando com estes achados, Ojha, Nandave; et al. (2008) utilizaram ratos Wistar machos para avaliar o efeito cardioprotetor do extrato hidro-alcoólico da TT (250mg/kg, uma vez ao dia por 30 dias). Os resultados encontrados demonstraram que a capacidade protetora do extrato de TT pode ser devido à restauração da capacidade antioxidante do miocárdio endógena ou da atividade de eliminação de radicais livres, juntamente com a correção dos parâmetros hemodinâmicos alterados e da preservação das alterações citoarquitetural e ultra-estruturais cardíacas.

Uma ampla variedade de compostos tem sido extraídos a partir da TT: saponinas, flavonóides e alcalóides. Entre os compostos, vários estudos têm demonstrado que o principal constituinte desta planta, a protodioscina (PTN), uma saponina esteroide, é a principal responsável pela atividade biológica do extrato da TT (Kostova and Dinchev 2005).

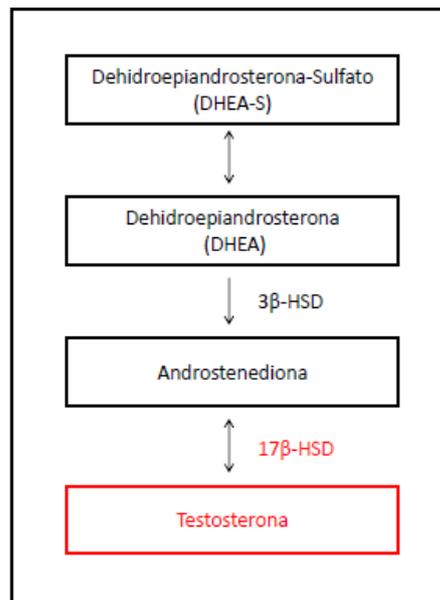
Figura 2: Estrutura química da protodioscina



Fonte: Modificado de Gauthaman, Ganesan et al. (2003)

Desta forma, como a TT foi conhecida por sua qualidade afrodisíaca, diversos estudos foram realizados para desvendar o mecanismo de ação envolvido, acredita-se que envolve a conversão da PTN para dehidroepiandrosterona (DHEA) e/ou seus precursores. Sabe-se que a DHEA no epidídimo é necessário para o processo de maturação dos espermatozoides, por sua vez, o DHEA pode aumentar a integridade da membrana celular e suas funções (Dyner, Lang et al. 1993), resultando em um melhor desempenho sexual e a sensação geral de bem-estar (Adimoelja and Adaikan 1997).

Figura 3: Correlação do hormônio Dehidroepiandrosterona-Sulfato (DHEA-S) sobre os níveis de testosterona sérica.



Fonte: Arquivo pessoal

Em um estudo realizado por Gauthaman, Adaikan et al. (2002), foram avaliadas as propriedades afrodisíacas do extrato de TT contendo PTN em ratos normais e castrados, os animais receberam água, testosterona (10 mg/Kg), ou PTN (apenas castrados - 5 mg/Kg). Os ratos castrados administrados com a testosterona ou PTN mostraram um aumento significativo na frequência de montagens e intromissões e uma diminuição na latência de montagens, intromissões e ejaculações quando comparados com os ratos castrados administrados apenas com a água. Os efeitos afrodisíacos observados neste estudo podem ser devido ao aumento nos níveis de andrógenos nos grupos tratado com PTN. Os resultados foram confirmados por outro estudo realizado por Gauthaman, Ganesan et al. (2003), que

utilizaram ratos machos não castrados, onde administraram várias concentrações de TT (2,5, 5, 10 mg/Kg), e verificaram o aumento dos níveis hormonais.

O tecido dos corpos cavernosos obtidos a partir de coelhos brancos da Nova Zelândia, após o tratamento com TT foram testados *in vitro* com vários agentes farmacológicos e de estimulação do campo elétrico e verificou-se ter um efeito pró-erétil nos animais que utilizaram a TT, desta forma corroborando com os outros achados encontrados na literatura (Adaikan, Gauthaman et al. 2000).

Desta forma, considerando os efeitos tóxicos ocasionados no sistema reprodutor masculino de usuários da CP e que o uso deste quimioterápico causa bastante dúvida, pois a infertilidade tem um papel crítico e um impacto tanto físico como emocional na decisão do uso deste medicamento, é que acreditamos que a utilização de um composto natural com potencial antioxidante e esteroideogênico poderia ser uma alternativa promissora para auxiliar na prevenção da toxicidade reprodutiva induzida pela CP.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- Uma única dose de CP (100mg/kg) causa dano no sistema reprodutor masculino de camundongos evidenciado pelo aumento das ER, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas nos testículos destes animais.
- Os danos oxidativos ocasionados pela CP também foram evidenciados através da alteração da atividade das enzimas antioxidantes, como: SOD, CAT, GPx, GR, GST.
- Além de perturbar o equilíbrio redox nos testículos e conduzir a um estresse oxidativo, ao analisarmos a atividade da enzima 17 β -HSD, a qual está envolvida na síntese de hormônios esteroidais e comparamos com a avaliação dos níveis séricos de testosterona, concluímos que além do dano ocasionado pelo estresse oxidativo, a CP também apresenta um efeito na esteroidogênese.
- Quando verificamos estes achados e comparamos com a avaliação histopatológica dos testículos juntamente com a avaliação do sêmen destes animais, concluímos que uma única dose de CP foi capaz de alterar células responsáveis pela maturação e qualidade seminal e isso foi evidenciado na análise do sêmen destes animais pela diminuição do VCL, motilidade, vigor e integridade de membrana.
- Ao analisarmos em HPLC o extrato de TT utilizado para este estudo, foi possível verificar que ele é rico em PTN (166.24 μ g/mL), o maior constituinte e apontado por ser o principal responsável pelas ações benéficas da TT.
- O efeito benéfico do extrato seco de TT foi verificado através da proteção que este extrato ocasionou ao sistema reprodutor masculino de camundongos, melhorando os parâmetros de estresse oxidativo, dos níveis de testosterona sérica, bem como da enzima 17 β -HSD. Também foi possível verificar que as avaliações histopatológicas e seminais destes animais melhoraram ao nível do grupo controle, demonstrando assim sua eficácia em proteger contra o dano causado por este quimioterápico.
- Por fim, acreditamos que o extrato de TT possui a capacidade de proteger contra os danos induzidos pela CP, e que seu maior constituinte a PTN poderia ser a responsável pela maioria das suas ações benéficas avaliadas neste estudo.

6 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Avaliar o efeito do extrato seco de TT em um modelo de exposição crônica a CP, a fim de avaliar os danos ocasionados pela droga no sistema reprodutor, e compará-los à exposição aguda.
- Avaliar o efeito da CP na prole de machos expostos cronicamente ao quimioterápico, bem como verificar o papel protetor do extrato seco de TT sobre a ninhada.
- Verificar efeito da PTN sobre o comportamento sexual e sistema reprodutor de ratos expostos de forma aguda e crônica a ciclofosfamida e comparar aos efeitos ocasionados pelo extrato seco de TT.
- Testar modelo agudo e/ou crônico de exposição à CP em camundongas, a fim de avaliar os danos ocasionados pelo quimioterápico sobre o sistema reprodutor feminino, e o possível papel protetor do extrato seco de TT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El Tawab, A. M., N. N. Shahin and M. M. AbdelMohsen (2014). "Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats." Chem Biol Interact **224C**: 196-205.
- Adimoelja, A. and P. G. Adaikan (1997). "Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L improves the male sexual functions, probably via DHEA " International Journal of Impotence Research **9**(1): 64.
- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol **105**: 121-126.
- Agarwal, A., K. P. Nallella, S. S. R. Allamaneni and T. M. Said (2004). "Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature." Reproductive Biomedicine Online **8**(6): 616-627.
- Akram, M., H. M. Asif, N. Akhtar, P. A. Shah, M. Uzair, G. Shaheen, T. Shamim, S. M. A. Shah and K. Ahmad (2011). "Tribulus terrestris Linn.: A review article." Journal of Medicinal Plants Research **5**: 3601–3605.
- Al-Rawi, H. S. D. a. A. (1985). Flora Of Kuwait. London, KPI Publised.
- Alexi, T., P. E. Hughes, R. L. M. Faull and C. E. Williams (1998). "3-nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration." Neuroreport **9**(11): R57-R64.
- Amin, A., M. Lotfy, M. Shafiullah and E. Adeghate (2006). "The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes." Ann N Y Acad Sci **1084**: 391-401.
- Anderson, D., J. B. Bishop, R. C. Garner, P. Ostrosky-Wegman and P. B. Selby (1995). "Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks." Mutat Res **330**(1-2): 115-181.
- Aykac, G., M. Uysal, A. S. Yalcin, N. Kocak-Toker, A. Sivas and H. Oz (1985). "The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats." Toxicology **36**(1): 71-76.
- Bansal, A. and G. Bilaspuri (2010). "Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions." Veterinary Medicine International **7**.
- Boddy, A. V. and S. M. Yule (2000). "Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines." Clin Pharmacokinet **38**(4): 291-304.
- Boonsorn, T., W. Kongbuntad, Nual-Narkkong and W. Aengwanish (2010). "Eeffects of Catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen." American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture **7**(3): 283-288.
- Borgmann, S., M. Haubitz and S. G. Schwab (2002). "Lack of association of alpha-1 antichymotrypsin gene polymorphism with PR3-ANCA and MPO-ANCA associated vasculitis." Autoimmunity **35**(7): 435-439.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Carlberg, I. and B. Mannervik (1985). "Glutathione reductase." Methods Enzymol **113**: 484-490.
- Chakraborty, P., U. H. Sk and S. Bhattacharya (2009). "Chemoprotection and enhancement of cancer chemotherapeutic efficacy of cyclophosphamide in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma by diphenylmethyl selenocyanate." Cancer Chemother Pharmacol **64**(5): 971-980.
- Charak, B. S., R. Gupta, P. Mandrekar, N. A. Sheth, S. D. Banavali, T. K. Saikia, R. Gopal, K. A. Dinshaw and S. H. Advani (1990). "Testicular dysfunction after cyclophosphamide-vincristine-procarbazine-prednisolone chemotherapy for advanced Hodgkin's disease. A long-term follow-up study." Cancer **65**(9): 1903-1906.

- Chen, Q., E. J. Vazquez, S. Moghaddas, C. L. Hoppel and E. J. Lesnefsky (2003). "Production of reactive oxygen species by mitochondria—central role of complex III." The Journal of Biological Chemistry **278**(38): 36027–36031.
- Colvin, M. and J. Hilton (1981). "Pharmacology of cyclophosphamide and metabolites." Cancer Treat Rep **65 Suppl 3**: 89-95.
- Crook, T. R., R. L. Souhami and A. E. McLean (1986). "Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells." Cancer Res **46**(10): 5029-5034.
- Das, U. B., M. Mallick, J. M. Debnath and D. Ghosh (2002). "Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats." Asian J Androl **4**(3): 201-207.
- de Jonge, M. E., A. D. Huitema, S. Rodenhuis and J. H. Beijnen (2005). "Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide." Clin Pharmacokinet **44**(11): 1135-1164.
- Dinchev, D., B. Janda, L. Evstatieva, W. Oleszek, M. R. Aslani and I. Kostova (2008). "Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions." Phytochemistry **69**(1): 176-186.
- Dollery, C. T. (1999). Therapeutic Drugs. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Elangovan, N., T. J. Chiou, W. F. Tzeng and S. T. Chu (2006). "Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice." Toxicology **222**(1-2): 60-70.
- Gauthaman, K., P. G. Adaikan and R. N. Prasad (2002). "Aphrodisiac properties of *Tribulus Terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats." Life Sci **71**(12): 1385-1396.
- Gauthaman, K. and A. P. Ganesan (2008). "The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction--an evaluation using primates, rabbit and rat." Phytomedicine **15**(1-2): 44-54.
- Gauthaman, K., A. P. Ganesan and R. N. Prasad (2003). "Sexual effects of puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (protodioscin): an evaluation using a rat model." J Altern Complement Med **9**(2): 257-265.
- Geller, M., H. A. Dickie, D. A. Kass, G. R. Hafez and J. J. Gillespie (1976). "The histopathology of acute nitrofurantoin-associated pneumonitis." Ann Allergy **37**(4): 275-279.
- Ghosh, D., U. B. Das, S. Ghosh, M. Mallick and J. Debnath (2002). "Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress." Drug Chem Toxicol **25**(3): 281-292.
- Gianni, P., J. J. Kaczor, M. J. Douglas, P. M. Stuart and M. A. Tarnopolsky (2004). "Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle." Experimental Gerontology **39**(9): 1391-1400.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." J Biol Chem **249**(22): 7130-7139.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive Oxygen Species in Living Systems - Source, Biochemistry, and Role in Human-Disease." American Journal of Medicine **91**: S14-S22.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1990). "Role of Free-Radicals and Catalytic Metal-Ions in Human-Disease - an Overview." Methods in Enzymology **186**: 1-85.
- Harrison, R. A. and S. E. Vickers (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." J Reprod Fertil **88**(1): 343-352.
- Haubitz, M., F. Bohnenstengel, R. Brunkhorst, M. Schwab, U. Hofmann and D. Busse (2002). "Cyclophosphamide pharmacokinetics and dose requirements in patients with renal insufficiency." Kidney Int **61**(4): 1495-1501.
- Hemminki, K. and S. Kallama (1986). "Reactions of nitrogen mustards with DNA." IARC Sci Publ(78): 55-70.

- Hoorweg-Nijman, J. J., H. A. Delemarre-van de Waal, F. C. de Waal and H. Behrendt (1992). "Cyclophosphamide-induced disturbance of gonadotropin secretion manifesting testicular damage." Acta Endocrinol (Copenh) **126**(2): 143-148.
- Howell, S. and S. Shalet (1998). "Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy." Endocrinol Metab Clin North Am **27**(4): 927-943.
- Jalali, A. S., S. Hasanzadeh and H. Malekinejad (2012). "Crataegus monogyna aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences." Acta Med Iran **50**(1): 1-8.
- Jarabak, J., J. A. Adams, H. G. Williams-Ashman and P. Talalay (1962). "Purification of a 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta and studies on its transhydrogenase function." J Biol Chem **237**: 345-357.
- Joseph, P. D. (1997). Molecular Toxicology. New York: Oxford University Press.
- Kaur, F., G. K. Sangha and G. S. Bilaspuri (1997). "Cyclophosphamide-induced structural and biochemical changes in testis and epididymidis of rats." Indian J Exp Biol **35**(7): 771-775.
- Kenney, L. B., M. R. Laufer, F. D. Grant, H. Grier and L. Diller (2001). "High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood." Cancer **91**(3): 613-621.
- Kern, J. C. and J. P. Kehrer (2002). "Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis." Chemico-Biological Interactions **139**(1): 79-95.
- Korkmaz, A., T. Topal and S. Oter (2007). "Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation." Cell Biol Toxicol **23**(5): 303-312.
- Kostova, I. and D. Dinchev (2005). "Saponins in Tribulus terrestris – Chemistry and Bioactivity." Phytochemistry Reviews **4**(2-3): 111-137.
- Kwolek-Mirek, M., R. Zadrag-Tecza, S. Bednarska and G. Bartosz (2014). "Acrolein-Induced Oxidative Stress and Cell Death Exhibiting Features of Apoptosis in the Yeast Saccharomyces cerevisiae Deficient in SOD1." Cell Biochem Biophys.
- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel and E. R. Stadtman (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-478.
- Makker, K., A. Agarwal and R. Sharma (2009). "Oxidative stress & male infertility." Indian Journal of Medical Research **129**(4): 357-367.
- Manda, K. and A. L. Bhatia (2003). "Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice." Cell Biol Toxicol **19**(6): 367-372.
- Maneesh, M. and H. Jayalekshmi (2006). "Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction." Indian J Clin Biochem **21**(2): 80-89.
- Martino-Andrade, A. J., R. N. Morais, K. M. Spercoski, S. C. Rossi, M. F. Vechi, M. Golin, N. F. Lombardi, C. S. Greca and P. R. Dalsenter (2010). "Effects of Tribulus terrestris on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats." J Ethnopharmacol **127**(1): 165-170.
- Matsui, H., K. Mitsumori, K. Yasuhara, H. Onodera, T. Shimo and M. Takahashi (1995). "Morphological evaluation of cyclophosphamide testicular toxicity in rats using quantitative morphometry of spermatogenic cycle stages." J Toxicol Sci **20**(4): 407-414.
- Meistrich, M. L., N. Parchuri, G. Wilson, B. Kurdoglu and M. Kangasniemi (1995). "Hormonal protection from cyclophosphamide-induced inactivation of rat stem spermatogonia." J Androl **16**(4): 334-341.
- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase." J Biol Chem **247**(10): 3170-3175.

- Motawi, T. M., N. A. Sadik and A. Refaat (2010). "Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder." Food Chem Toxicol **48**(8-9): 2326-2336.
- Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." Anal Biochem **95**(2): 351-358.
- Ojha, S. K., M. Nandave, S. Arora, R. Narang, A. K. Dinda and D. S. Arya (2008). "Chronic Administration of Tribulus terrestris Linn. Extract Improves Cardiac Function and Attenuates Myocardial Infarction in Rats." International Journal of Pharmacology **4**(1): 1-10.
- Ojha, S. K., M. Nandave, S. Arora, R. Narang, A. K. Dinda, and D. S. Arya. (2008). "Chronic Administration of Tribulus terrestris Linn. Extract Improves Cardiac Function and Attenuates Myocardial Infarction in Rats." International Journal of Pharmacology **4**(1): 1-10.
- Paglia, D. E. and W. N. Valentine (1967). "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase." J Lab Clin Med **70**(1): 158-169.
- Rajendar, B., K. Bharavi, G. S. Rao, P. V. Kishore, P. R. Kumar, C. S. Kumar and T. P. Patel (2011). "Protective effect of an aphrodisiac herb Tribulus terrestris Linn on cadmium-induced testicular damage." Indian J Pharmacol **43**(5): 568-573.
- Selvakumar, E., C. Prahalthan, P. T. Sudharsan and P. Varalakshmi (2006). "Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity." Clin Chim Acta **367**(1-2): 114-119.
- Silvis, N. G. (2005). "ANTIMETABOLITES AND CYTOTOXIC DRUGS." Dermatologic Clinics **19**(1): 105-118.
- Siu, E. R., D. D. Mruk, C. S. Porto and C. Y. Cheng (2009). "Cadmium-induced testicular injury." Toxicol Appl Pharmacol **238**(3): 240-249.
- Sotomayor, R. E. and R. B. Cumming (1975). "Induction of translocations by cyclophosphamide in different germ cell stages of male mice: cytological characterization and transmission." Mutat Res **27**(3): 375-388.
- Timbrell, J. (2000). Principles of Biochemical Toxicology. London.
- Tomova, M., R. Gjulemetova, S. Zarkova, S. Peeva, T. Pangarova and M. Simova (1981). Steroidal saponins from Tribulus terrestris L. with a stimulating action on the sexual functions. International Conference of Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, Varna, Bulgaria. **3**: 298-302.
- Tripathi, D. N. and G. B. Jena (2008). "Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells." Toxicology **248**(2-3): 96-103.
- Tripathi, D. N. and G. B. Jena (2009). "Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice." Chem Biol Interact **180**(3): 398-406.
- Turner, T. T. and J. J. Lysiak (2008). "Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction." J Androl **29**(5): 488-498.
- Vernet, P., R. J. Aitken and J. R. Drevet (2004). "Antioxidant strategies in the epididymis." Mol Cell Endocrinol **216**(1-2): 31-39.
- Wei, X., F. Su, X. Su, T. Hu and S. Hu (2012). "Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg3 on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice." Fitoterapia **83**(4): 636-642.
- Yu, L. J., P. Drewes, K. Gustafsson, E. G. Brain, J. E. Hecht and D. J. Waxman (1999). "In vivo modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: impact on pharmacokinetics and antitumor activity." J Pharmacol Exp Ther **288**(3): 928-937.
- Zanchi, M. M., V. Manfredini, D. d. S. Brum, L. M. Vargas, C. C. Spiazzi, M. B. Soares, A. P. Izaguirry and F. W. Santos (2015). "Green tea infusion improves cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system." Toxicology Reports **2**: 252-260.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: 027/2015

Título: Avaliação do potencial protetor do extrato de *Tribulus terrestris* sobre o sistema reprodutor masculino de camundongos através do dano induzido por ciclofosfamida.

Data da aprovação: 24/07/2015

Período de vigência do projeto: De: 07/2015 Até: 07/2018

Pesquisador: Francielli Webber Santos Cibin

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 9968-8269

E-mail: franciellcibin@unipampa.edu.br

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcelo Dal Pozzo', written over a horizontal line.

Marcelo Dal Pozzo
Médico Veterinário
Coordenadora Pro Tempore da CEUA/UNIPAMPA