

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
MICHELLE EGLE TORRES SILVA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DE *AJUGA TURKESTANICA* NO PESO  
CORPORAL, PESO DOS ÓRGÃOS E PERFIL BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO

Uberaba -MG  
2019



MICHELLE EGLE TORRES SILVA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DE *AJUGA TURKESTANICA* NO PESO CORPORAL, PESO DOS ÓRGÃOS E PERFIL BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Uberaba, como parte dos requisitos para a obtenção de Título de Mestre em Odontologia, na área de concentração Biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior

Uberaba-MG  
2019

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

S38e Silva, Michelle Egle Torres.  
Efeito da suplementação com extrato de *Ajuga turkestanica* no peso corporal, peso dos órgãos e perfil bioquímico de ratos Wistar submetidos ao exercício de natação / Michelle Egle Torres Silva. – Uberaba, 2019.  
48 f. : il. color.  
Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área Biopatologia.  
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior.

1. Plantas perenes. 2. Natação animal – Experimentos. 3. Metabolismo. I. Thedei Junior, Geraldo. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área Biopatologia. III. Título.

CDD 582.16

MICHELLE EGLE TORRES SILVA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DE *AJUGA TURKESTANICA* NO PESO CORPORAL, PESO DOS ÓRGÃOS E PERFIL BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Mestrado da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: BIOPATOLOGIA.

Aprovado(a) em: 20/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior  
Orientador  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha  
Instituto Federal de Ciências e Tecnologia



## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram a estudar.

Ao meu esposo pelo carinho e compreensão em todos os momentos.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor e orientador, Dr. Geraldo Thedei Júnior pela excelente oportunidade de realizar este trabalho sobre vossa orientação, pela confiança e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao meu esposo, Thiago de Oliveira Tavares, pelo companheirismo, apoio constante e compreensão pela minha ausência nos momentos em que me encontrava dedicando ao desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus pais, Antônio Carlos da Silva e Vilma Cândida Silva pelo incentivo que sempre me deram para estudar.

Ao meu irmão Mateus e minha cunhada Laise que sempre acreditaram em mim.

Às minhas irmãs Polliane e Grezielle, ao meu cunhado Thiago que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos alunos Eloy, Matheus, Victor e Alfredo pela colaboração na execução deste projeto, desde o momento do preparo da dieta experimental até ao sacrifício dos animais.

Aos meus amigos de curso em especial à Keyzyhuanda Bernardes e Ellen Abud, professores e demais funcionários da Universidade de Uberaba, nos quais encontrei compreensão, estímulo e cooperação.



## RESUMO

*Ajuga turkestanica* é uma planta perene típica da Ásia Central, onde é usada pelo suposto efeito positivo no metabolismo de lipídios, para aumentar a performance esportiva, tratar doenças cardíacas, dores estomacais, elevar a síntese de proteínas, manter o metabolismo anabólico, aumentar a massa muscular e reduzir o tecido adiposo. Vários estudos mostraram que o extrato dessa planta apresenta uma série de compostos bioativos denominados coletivamente “fitoecdisteroides”, entre eles a turkesterona. O objetivo desse trabalho foi identificar o efeito do extrato de *Ajuga turkestanica* (EAT) no peso corporal, peso dos órgãos e perfil bioquímico de ratos Wistar adultos submetidos ao exercício de natação. Foram utilizados 29 ratos Wistar machos adultos, divididos em 4 grupos sendo: grupo 1- controle (n=5); grupo 2, que recebeu EAT (EAT, n=6); grupo 3, que realizou o exercício de natação (NAT, n=9) e grupo 4, que recebeu o EAT e foi submetido à natação (EAT + NAT, n=9). Os animais do grupo EAT e do grupo EAT + NAT receberam 36mg/Kg de peso corporal do extrato comercial de *A. turkestanica*, enquanto os grupos controle e NAT receberam solução salina. Durante o período experimental, o peso e comprimento dos animais foram monitorados semanalmente. O protocolo de natação consistiu de períodos de curta duração e alta intensidade, com duração de 6 semanas consecutivas. Ao término do experimento os animais foram eutanasiados e seus órgãos coletados e pesados (baço, epidídimo, fígado, rins, testículos, vesícula seminal), tecidos adiposos (periepididimal e perirrenal), e músculos (quadríceps femural, tríceps sural, posterior da coxa), e colhidas amostras de sangue para análises bioquímicas. Utilizou-se o software estatístico GraphPad Prism 7 for Windows, para as análises estatísticas e confecção dos gráficos. Todos os grupos foram comparados com o grupo controle. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que o EAT isoladamente não induziu alteração significativa no peso corporal, peso dos órgãos ou no perfil bioquímico dos animais comparados ao grupo controle. Para os animais que foram submetidos ao exercício de natação associado com EAT, houve redução significativa do Índice de Lee ( $p=0,046$ ), triglicérides ( $p=0,018$ ) e colesterol total ( $p=0,048$ ), enquanto os níveis de HDL foram reduzidos pelo exercício de natação ( $p=0,002$ ) e com a natação associada à administração do EAT ( $p=0,009$ ). Esses resultados sugerem uma possível ação fisiológica do EAT.

Palavras-chave: Turkesterona, Natação, Metabolismo.



## ABSTRACT

*Ajuga turkestanica* is a perennial plant typical of Central Asia where it is used for the supposed positive effect on lipid metabolism, to increase sports performance, treat heart disease, stomach pains, raise protein synthesis, maintain anabolic metabolism, increase mass muscle and reduce adipose tissue. Several studies have shown that the extract of this plant presents a series of bioactive compounds collectively called "phytoecdysteroids", among them turkesterone. The objective of this work was to identify the effect of the extract of *Ajuga turkestanica* (EAT) on body weight, body weight and biochemical profile of adult Wistar rats submitted to swimming exercise. Twenty-nine adult male Wistar rats were divided into four groups: group 1-control (n = 5); group 2, who received EAT (EAT, n = 6); group 3, who performed the swimming exercise (NAT, n = 9) and group 4, who received the EAT and was submitted to swimming (EAT + NAT, n = 9). The animals of the EAT group and the EAT + NAT group received 36 mg / kg of body weight of *A. turkestanica* commercial extract, while the control and NAT groups received saline solution. During the experimental period, the weight and length of the animals were monitored weekly. The swimming protocol consisted of periods of short duration and high intensity, with duration of 6 consecutive weeks. At the end of the experiment, the animals were euthanized and their organs were collected and weighed (spleen, epididymis, liver, kidneys, testicles, seminal vesicles), adipose tissue (periepididimal and perirenal), and muscles (quadriceps femoral, triceps sural, posterior thigh) , and blood samples were collected for biochemical analysis. Statistical software GraphPad Prism 7 for Windows was used for statistical analysis and graphing. All groups were compared with the control group. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . The data obtained in the present study showed that EAT alone did not induce significant alteration in body weight, organ weight or in the biochemical profile of the animals compared to the control group. For the animals that were submitted to the swimming exercise associated with EAT, there was a significant reduction of the Lee Index ( $p = 0.046$ ), triglycerides ( $p = 0.018$ ) and total cholesterol ( $p = 0.048$ ), while HDL levels were reduced by swimming exercise ( $p = 0.002$ ) and swimming associated with EAT administration ( $p = 0.009$ ). These results suggest a possible physiological action of EAT.

Key words: Turkesterone, Swimming, Metabolism



## SUMÁRIO

1	Introdução.....	01
2	Justificativa.....	06
3	Objetivos.....	07
	3.1. Geral.....	07
	3.2. Específicos.....	07
4	Material e Métodos.....	08
	4.1. Aspectos Éticos.....	08
	4.2. Manutenção dos animais e formação dos grupos.....	08
	4.3. Dieta.....	09
	4.4. Preparo do EAT e administração.....	09
	4.5. Exercício de natação.....	10
	4.6. Determinação do efeito do EAT no peso corporal dos animais.....	13
	4.7. Eutanásia.....	13
	4.8. Determinação do efeito do EAT no Índice de Lee.....	13
	4.9. Determinação do efeito do EAT no perfil bioquímico.....	14
	4.9.1. Dosagem de Glicose, Colesterol, Creatinina, HDL.....	14
	4.9.2. Dosagem de Triglicérides.....	14
	4.9.3. Dosagem de TGP e TGO, Albumina Plasmática.....	14
	4.9.4. Na dosagem de Proteína Total, Ureia.....	14
	4.9.5. Na dosagem de Amilase.....	14
	4.10. Determinação do efeito do EAT no peso dos órgãos e tecidos.....	14
	4.11. Análise estatística.....	15
5	Resultados.....	16
6	Discussão.....	28
7	Conclusão.....	32
8	Referências Bibliográficas.....	33
9	Anexo.....	36



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da 20–hidroxiecdisona e testosterona.....	03
Figura 2: Estrutura Beta-ecdisterona e turkesterona.....	05
Figura 3: Manutenção dos animais.....	08
Figura 4: Administração do EAT / solução salina.....	10
Figura 5: Exercício de natação.....	11
Figura 6: Exercício de natação com peso de chumbo.....	12
Figura 7: Peso dos animais.....	16
Figura 8: Índice de Lee.....	17
Figura 9: Peso relativo dos Rins.....	18
Figura 10: Peso relativo dos Testículos e Vesícula Seminal.....	19
Figura 11: Peso relativo do Baço, Fígado e Epidídimo .....	20
Figura 12: Peso relativo dos Músculos.....	21
Figura 13: Peso relativo dos Tecidos Adiposos.....	22
Figura 14: Dosagens Bioquímicas de Proteína Total e Albumina.....	23
Figura 15: Dosagens Bioquímicas de Ureia e Creatinina.....	23
Figura 16: Dosagem Bioquímica de Triglicérides.....	24
Figura 17: Dosagem Bioquímica de HDL.....	24
Figura 18: Dosagem Bioquímica de Colesterol Total.....	25
Figura 19: Dosagem Bioquímica de Amilase.....	25
Figura 20: Dosagem Bioquímica de TGO e TGP.....	26
Figura 21: Dosagem Bioquímica de Glicose.....	26



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Formação dos grupos experimentais.....	09
Quadro 2: Composição centesimal da dieta controle.....	09
Quadro 3: Quantidade de sessões de natação por dias da semana.....	11
Quadro 4: Intensidade conforme a evolução do exercício.....	12



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso dos animais e Índice de Lee.....	16
Tabela 2: Peso relativo dos órgãos.....	18
Tabela 3: Perfil Bioquímico.....	22



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

TK - Turkesterona

Nat - Natação

ER – Receptor de estrógeno

EAT – Extrato de *Ajuga turkestanica*

*A. turkestanica* - *Ajuga turkestanica*

EAA – Esteroide Anabólico Androgênico

20-HE – 20-Hidroxiecdisona

*ad libitum*- À vontade

HDL – lipoproteína de densidade alta

LDL – lipoproteína de baixa densidade

SNC – Sistema nervoso central

IGF – growth factor 1

$\beta$ - beta

C3 – carbono 3

C17 – carbono 17



## 1. INTRODUÇÃO

O padrão de beleza imposto pela mídia nos dias atuais adota o culto ao corpo perfeito, gerando preocupações e insatisfações dos indivíduos com a própria imagem corporal (VARGAS, 2014).

As preocupações com a imagem corporal geram insegurança social, baixa autoestima e sentimentos de inferioridade, que seriam resolvidos se a pessoa tivesse corpos belos e fortes, porém, nesta busca do corpo perfeito tem sido identificado alto índice de dismorfia muscular, provocando alterações da percepção da autoimagem e prejuízos socioculturais, na saúde e bem-estar dos indivíduos (AZEVEDO, 2012).

O exercício físico sistematizado quando realizado de forma correta pode acarretar diversos benefícios tanto na esfera física quanto mental do ser humano, proporcionando uma melhor qualidade de vida (MELLO, 2005). Para o autor, há indivíduos que se envolvem na prática de exercícios físicos com tal intensidade e/ou frequência ou, ainda, fazem uso de drogas ilícitas que podem trazer prejuízos à saúde, como por exemplo, o dependente de exercício físico e o usuário de esteroides anabolizantes.

Os esteroides anabolizantes foram inicialmente desenvolvidos para fins terapêuticos, como, para tratamento de pacientes com deficiência natural de andrógenos, atrofia muscular, tratamento da osteoporose e no câncer de mama. A atividade anabólica da testosterona proporciona um ganho de massa muscular por aumentar a síntese proteica no músculo e conseqüentemente diminuindo os riscos de lesões musculares (ROCHA et al, 2007).

Dentre a testosterona e seus derivados, os esteroides anabolizantes mais consumidos listados pelo *National Institute on Drug Abuse* (NIDA, 2001) são: Anadrol (oximetolona), Oxandrim (oxandrolona), Dianabol (metandrostenolona), Winstrol (estanozolol), Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona), Durabolin (fenilpropionato de nandrolona), Depo-testosterone (cipionato de testosterona), Equipoise (undecilenato de boldenona).

A prática de musculação e o uso de esteroides anabolizantes, são motivados por fins estéticos. A busca pelo corpo ideal disseminado pela mídia, o receio de ser desvalorizado e excluído de grupos, o imediatismo na obtenção de resultados favorece o uso indiscriminado de anabolizantes, tornando-se atualmente um problema de saúde pública (IRIART, 2009).

O uso excessivo de esteroides anabolizantes pode trazer diversas alterações nocivas como aparecimento de distúrbios cardíacos (ROCHA et al, 2007), efeitos colaterais indesejáveis no fígado e sistema reprodutivo (FILHO et al, 2006).

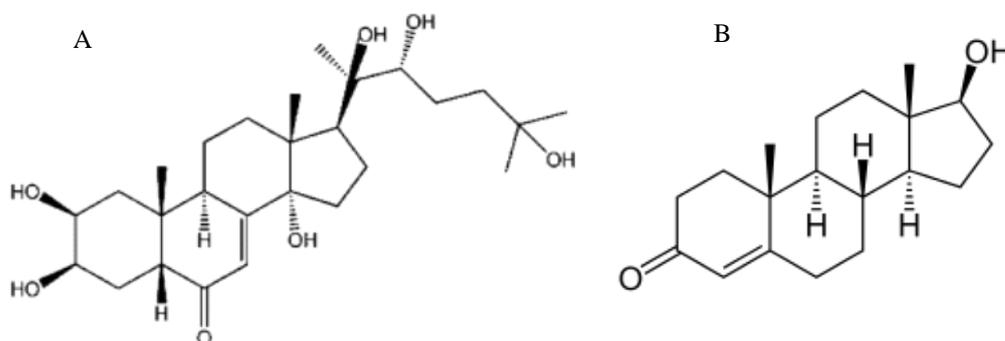
Os ecdisteroides são os hormônios de artrópodes, responsáveis pela regulação dos fenômenos de muda, metamorfose, reprodução e diapausa (LAFONT e DINAN, 2003). Alguns nomes comuns para ecdisteroides incluem ecdisten, ecdisona, isoinokosterona e  $\beta$ -ecdisterona (WILBORN et al, 2006).

Nos insetos, os ecdisteroides se ligam ao receptor da ecdisona nuclear, que dimeriza e se liga ao DNA, ativando a transcrição de genes envolvidos na muda (GORELICK-FELDMAN, 2008).

Em ratos machos, o tratamento com ecdisterona aumentou o tamanho das fibras musculares, o nível de IGF-1 sérico e reduziu os níveis de corticosterona e  $17\beta$ -estradiol. Em células de mioblastoma C2C12 diferenciadas, o tratamento com ecdisterona, resultou em hipertrofia muscular, que foi antagonizada por um antiestrogênio, mas não por um antiandrógeno. A potência anabólica da ecdisterona foi comparável ou ainda maior, conforme encontrado para os EAA (PARR et al, 2014). Esses autores também demonstraram um mecanismo de ação não-androgênico da ecdisterona, que seria mediado pela ligação a um receptor de estrógeno tipo beta. E sugerem ainda que a ecdisterona seja classificada na categoria "S1 Anabolic Agents" da lista de substâncias proibidas da Agência Mundial Antidoping.

Embora sejam também esteroides, os ecdisteroides são estruturalmente muito diferentes dos análogos andrógenos (Figura 1). Ecdisteroides não possuem o grupo cetona na posição C3. Eles contêm múltiplos grupos hidroxila, tornando os ecdisteroides muito mais polares e solúveis em água do que os andrógenos (muito lipofílicos) e possuem uma longa cadeia de carbono em C17, tornando-os muito mais volumosos do que os andrógenos. Isso reduz a probabilidade dos ecdisteroides se encaixem nos ligantes dos receptores nucleares projetados para andrógenos. Essas principais diferenças estruturais podem estar por trás da falta de efeitos colaterais androgênicos, timolíticos ou antigonadotrópicos dos ecdisteroides (GORELICK-FELDMAN, 2009).

**Figura 1.** Estrutura da 20-hidroxicadisona (A) e da testosterona (B).



Fonte: Báthori et al, 2008.

Báthori et al (2008), demonstraram que os ecdisteroides influenciam muitas funções fisiológicas e têm uma grande aplicação na farmacologia, com largo emprego sobre os mamíferos, incluindo os seres humanos. Dentre os ecdisteroides, a 20-hidroxicadisona vem sendo bastante investigada com ênfase nos eventos metabólicos.

Conforme Wilborn et al (2006), a 20-hidroxicadisona tem sido associada a atividades metabólicas incluindo a promoção da síntese de proteínas, manutenção do estado anabólico e intensificação de massa muscular magra, ao mesmo tempo, reduzindo tecido adiposo.

Em estudos sobre o efeito da 20-hidroxicadisona, Tóth et al (2008), demonstraram que esta substância atua diferente nas fibras musculares, sugerindo que este composto afeta o tamanho do tipo de fibra de uma forma específica do tecido muscular, agindo de forma análoga aos esteroides anabólicos androgênicos (EAA), alterando o processo da síntese proteica dessas células.

A 20-hidroxicadisona modifica o tamanho da fibra muscular em músculos normais e regenerados após lesão induzida por veneno de cobra, mesmo depois de uma semana de administração numa dose ligeiramente maior do que os esteroides anabolizantes, de forma dose dependente. A 20-hidroxicadisona provavelmente atua juntamente com outros fatores de crescimento, porque o seu efeito sobre os músculos normais é modificado pela presença de um músculo em regeneração (TÓTH et al, 2008).

Lafont e Dinan (2003), relata que as plantas possuem compostos análogos aos ecdisteroides dos insetos e estão presentes em 5-6% das espécies de plantas,

onde as concentrações geralmente são mais elevadas do que os normalmente encontrados em artrópodes.

Segundo Abdulkadirov (2005); Ramazanov (2005) e Gibout et al (2015), vários compostos bioativos similares aos ecdisteroides presentes nos artrópodes têm sido isolados em plantas. Entre eles a turkesterona, 20-hidroxiecdisona (20-HE), ciasterona, ciasterona 22-acetato, ajugalactone, ajugasterone B,  $\alpha$ -ecdisona e ecdisona 2,3-monoacetone, porém, suas funções em plantas não são tão bem esclarecidas.

Chakraborty (2016), em seu estudo em humanos que apresentam a doença de Alzheimer, demonstra a aplicabilidade do fitoecosteróide natural  $\beta$ -ecdisona, em múltiplos alvos na inibição da terapêutica da doença. A baixa toxicidade sistêmica tornaria uma alternativa viável no manejo da doença e também estenderia sua aplicabilidade como alimento funcional.

Os fitoecdisteroides, estruturalmente semelhantes aos hormônios da muda de insetos, produzem uma série de efeitos positivos, incluindo o aumento do crescimento e do desempenho físico. Nas células musculares esqueléticas, os fitoecdisteroides aumentam a síntese proteica. Ainda neste estudo, Gorelick-Feldman (2010) mostra que em uma linhagem de músculo esquelético de camundongo, C2C12, a 20-hidroxiecdisona (20HE), um fitoecdisteroide comum em ambos os insetos e plantas, provocou uma elevação rápida no cálcio intracelular, seguido por sustentada ativação da proteína B quinase e aumento da síntese de proteínas.

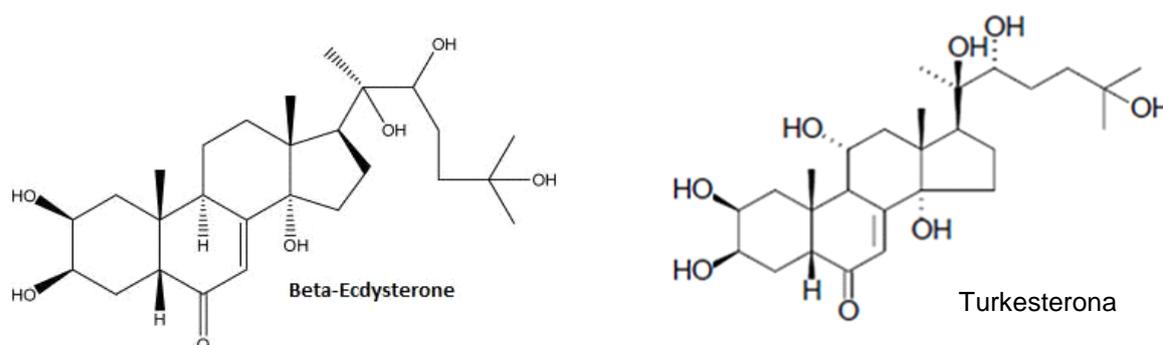
*Ajuga turkestanica* é uma planta usada em medicamentos tradicionais por seu alto conteúdo ecdisteroide, incluindo a presença de turkesterona particularmente ativa, que possui atividade anabólica eficiente, e após isolar e identificar ecdisteroides menores presentes em uma fração semi-purificada contendo 70% de turkesterona pelo método de espectrometria de massa de alta resolução, foram notificados 14 ecdisteroides, sendo dois principais, a turkesterona e 20-hidroxiecdisona (GUIBOUT et al, 2015).

A turkesterona é derivada da *A. turkestanica* que é uma planta perene que cresce na Ásia Central, tratando-se de uma fonte de substâncias bioativas, entre as quais, um hormônio fitoesteroide, ecdisteroide, que apresenta efeito positivo no metabolismo de lipídios, colaborando para o aumento da performance esportiva, muito utilizada, também, para o tratamento de doenças cardíacas, dores estomacais, síntese de proteínas, manutenção do metabolismo anabólico, aumento da massa muscular, enquanto diminui o tecido adiposo (LAFONT e DINAN, 2003).

Não há muitas evidências científicas acerca dos efeitos anabólicos da turkesterona, mas alguns estudos sobre os efeitos da ecdisterona, embora controversos, indicam um possível efeito anabólico (BÁTHORI et al, 2008).

Do ponto de vista estrutural, há uma aparente semelhança entre a  $\beta$ -ecdisterona e a turkesterona (Figura 2), uma vez que ambas apresentam a presença do núcleo esteroidal, 3 anéis de seis membros e 1 de cinco membros, e são compostos quirais, com vários centros assimétricos ou estereocentros. Estes compostos apresentam na sua estrutura, 6 e 7 grupamentos OH (hidroxila) respectivamente, o que lhes confere maior solubilidade em água, através das interações de hidrogênio, do que os esteroides andrógenos (BÁTHORI et al, 2008).

**Figura 2.** Estrutura química da  $\beta$ -Ecdisterona e da Turkesterona.



Fonte: Guibout et al, 2015 e Báthori et al, 2008

A administração de 20-hidroxiecdisona e turkesterona na dose de 5 mg/kg de peso corporal, resultou em alterações da atividade mitocondrial em ratos com hepatite. Alterações positivas foram encontradas na atividade poli enzimática nos sistemas de membranas da mitocôndria hepática, simultaneamente com um aumento em sua estabilidade e resistência ao efeito de fatores exógenos de produção a degradação de mitocôndrias (BÁTHORI et al, 2008).

Diante do exposto, os ecdiesteroides podem oferecer uma alternativa promissora na substituição dos EAA, inclusive como agente terapêutico no tratamento da atrofia muscular, mas devem como já ponderado anteriormente, serem mais estudados (BÁTHORI et al, 2008).

A hipótese do presente estudo é que um extrato comercial da *A. turkestanica* (EAT) exerce um efeito ergogênico sobre os ratos submetidos ao exercício de natação.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Este estudo é importante pois na literatura científica poucos são os relatos sobre o efeito da turkesterona (TK) e não existem estudos sobre o extrato comercial da *A. turkestanica* (EAT), principalmente associada ao exercício físico. Além disso, os estudos existentes empregam o composto purificado ou parcialmente purificado, diferentemente do EAT disponível para comercialização, de modo que se trata de um estudo inédito e relevante, justificando, assim, sua realização.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Determinar o efeito de um extrato comercial de *A. turkestanica* (EAT) no metabolismo de ratos *Wistar* machos adultos submetidos ao exercício de natação.

#### **3.2 Objetivo Específico**

- Avaliar os seguintes parâmetros fisiológicos ao final do experimento:
  - Peso corporal dos animais;
  - Índice de Lee dos animais;
  - Peso relativo dos órgãos (baço, epidídimo, fígado, rins, testículos, vesícula seminal)
  - Peso relativo dos tecidos (adiposo perirrenal, adiposo periepididimal);
  - Peso relativo dos tecidos musculares (quadríceps femural, tríceps sural, posterior da coxa);
  - Dosagens bioquímicas (glicose, colesterol, triglicérides, TGO, TGP, albumina plasmática, creatinina, proteína total, ureia, amilase, HDL).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

Todo o experimento foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal – COBEA e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba sob o protocolo CEEA–027/2018 (ANEXO 1).

### 4.2 Manutenção dos animais e formação dos grupos experimentais

Foram utilizados 29 (vinte e nove) ratos da linhagem *Wistar* machos adultos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia, com peso inicial de 350 gramas em média.

Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade de Uberaba, em caixas de polietileno com maravalha autoclavada, contendo de 3 a 5 animais, mostrados na Figura 3.

**Figura 3:** Manutenção dos animais em caixas com maravalha



Fonte: Dados da pesquisa

A temperatura do ambiente foi mantida entre 22 e 26°C e a luminosidade programada para ciclos de claro e escuro com duração de 12 horas cada.

Os animais foram inicialmente mantidos durante 1 (uma) semana para adaptação ao ambiente e amenizar os fatores de stress, em seguida, foram divididos em quatro grupos com números e pesos semelhantes, da seguinte forma, mostrados no Quadro 1.

**Quadro 1:** Formação dos grupos experimentais

Grupos	Quantidade de ratos <i>Wistar</i>
1- Controle	5
2- EAT	6
3- Natação	9
4- EAT + Natação	9

Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.3 Dieta

Fornecido água filtrada e dieta *ad libitum*. Utilizada a dieta padrão para ratos balanceada da marca Labina<sup>®</sup>, composta de carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico e aminoácidos, fornecendo 290 kcal/100g, conforme informações do fabricante apresentados no Quadro 2.

**Quadro 2:** Composição aproximada da dieta comercial para ratos empregada durante o estudo

Ingredientes	Quantidade (%)
Proteína	22,93
Gordura	3,35
Fibra	7,60
Umidade	10,45
Carboidrato	55,67
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

Fonte: dados do fabricante

#### 4.4 Preparo do Extrato de *A. turkestanica* (EAT) e administração

O EAT foi obtido no comércio da cidade de Uberaba (ANEXO 2).

A solução foi preparada diariamente no momento da administração, pesando-se o extrato seco (EAT) e dissolvendo-o em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Para a dosagem do EAT de 36 mg/Kg de peso corporal (aproximadamente 12,6 mg de

extrato) foi pesado 189 miligramas de EAT e dissolvido em 15 mL de solução salina estéril, considerando que foram 15 animais que receberam EAT. Após a preparação, 1 mL da solução foi aspirado para dentro de uma seringa plástica estéril adaptada em um tubo de cloreto de polivinila com aproximadamente 8 cm. O animal foi então contido por preensão dorsal, colocado em decúbito ventral e o tubo inserido no esôfago. O volume então injetado vagarosamente (15-20 segundos) para evitar distensão gástrica. Os animais do grupo controle e natação foram submetidos ao mesmo procedimento de gavagem, porém com a administração de um volume igual (1 mL) de solução salina estéril (Figura 4). A administração do EAT foi feita diariamente, no período da tarde (por volta das 17:30 horas) imediatamente antes do exercício de natação ao qual os animais foram submetidos. O protocolo do preparo e administração do EAT foi de acordo com o descrito na literatura (BELLOCHIO, 2016).

**Figura 4.** Administração do EAT / solução salina



Fonte: Dados da pesquisa

#### **4.5 Exercício de natação**

O tipo de exercício realizado no estudo consistiu em períodos de curta duração de atividade muscular de alta intensidade. O protocolo de treinamento da natação foi de acordo com o descrito na literatura (J. DIMAURO et al ,1992; BRITO, 2015).

O exercício consistiu em três a seis sessões de natação a cada 6 dias na semana, sendo que a natação foi realizada em 6 semanas. As sessões foram divididas conforme mostrado no Quadro 3.

**Quadro 3:** Quantidade de sessões de natação por dias da semana

Dias da semana	Número de sessões
segunda-feira	3 sessões
terça-feira	3 sessões
quarta-feira	4 sessões
quinta-feira	5 sessões
sexta-feira	5 sessões
sábado	6 sessões
domingo	descanso

Fonte: Dados da pesquisa

Cada sessão consistiu de três períodos de 30s de natação, sendo que cada nadada foi separada por um período de descanso de 90s. Cada sessão foi seguida por um período de recuperação de 3 minutos.

A natação foi realizada em um tanque dividido em 6 cubas, estas com dimensões de 60 cm de altura x 32 cm de comprimento x 24 cm de largura, com água potável na altura de 45 cm da cuba e mantida em 30°C durante todo o experimento (Figura 5, A e B).

**Figura 5:** Exercício de natação em vista lateral (A) e superior (B).



Fonte: Dados da pesquisa

No programa de exercícios, pequenos pesos de chumbo amarrados a elásticos foram colocados como coletes nas costas dos ratos para aumentar a intensidade do exercício (Figura 6).

**Figura 6:** Exercício de natação com peso de chumbo (A) e detalhe do peso (B)



Fonte : Dados da autora

Na primeira semana os animais realizaram o exercício sem peso, a fim de se adaptarem ao treinamento proposto, nas demais semanas foram colocados nos ratos o colete contendo o peso e aumentando estes conforme a evolução do exercício, mostrados no Quadro 4.

**Quadro 4:** Intensidade conforme a evolução do exercício

Semanas de treinamento	Peso do chumbo
Primeira semana	Sem peso
Segunda semana	Pesos iguais a 1% de sua massa corporal.
Terceira semana	Pesos iguais a 2% de sua massa corporal
Quarta semana	Pesos iguais a 4% de sua massa corporal
Quinta semana	Pesos iguais a 6% de sua massa corporal
Sexta semana	Pesos iguais a 7% de sua massa corporal

Fonte: Dados da pesquisa

Após a natação os animais foram enxutos com toalhas de pano e secos com secador. Os animais do grupo controle e os do grupo que receberam EAT foram apenas molhados e secos imediatamente.

#### 4.6 Determinação do efeito do Extrato da *A. turkestanica* no peso corporal dos animais

Os ratos foram pesados semanalmente antes do exercício da natação com uma balança digital Filizolla com precisão de 0,5g. Para realização da pesagem dos animais, colocou-se uma caixa de polipropileno na balança, desconsiderando-se o peso da mesma através da função “tarar”, em seguida, colocava-se em seu interior um rato por vez, obtendo assim, o peso do animal.

#### 4.7 Eutanásia

Ao final do experimento, os animais foram mantidos por 12 horas em jejum e então anestesiados com administração de Tiopental, sendo utilizado 30 mg/Kg de peso corporal, diluído em solução fisiológica e administrado via intraperitoneal. A dose de anestésico administrada deprime intensamente o SNC, permitindo que o sacrifício seja feito sem sofrimento. Após a confirmação da anestesia (por meio da ausência de sinais como reflexo da cauda e reflexo palpebral), os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica (tábua revestida com fórmica), os membros imobilizados e o animal submetido à laparotomia e exposição da cavidade abdominal. Procedia-se a punção da artéria renal esquerda com seringa de 10 ml, agulha 25X8 para coleta de sangue (10ml) para proceder as dosagens bioquímicas. O diafragma foi seccionado provocando pneumotórax para promover a morte do animal por hipóxia. Em seguida, foi feita a perfusão de salina e formalina para lavagem do sistema vascular e fixação dos órgãos.

#### 4.8 Determinação do efeito do Extrato da *A. turkestanica* no Índice de Lee

O índice de massa corporal baseado no Índice de Lee foi realizado medindo o comprimento naso-anal dos animais (em cm) e peso (em gramas). O Índice de Lee é determinado pela seguinte fórmula conforme descrito por Bernardis e Patterson (1968).

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso em (g)}}}{\text{comprimento naso anal (cm)}} \times 1000$$

#### **4.9 Determinação do efeito do Extrato da *A. turkestanica* no perfil bioquímico**

Todas as dosagens bioquímicas foram realizadas no laboratório de análises clínicas da Universidade de Uberaba, utilizando-se kits comerciais e o aparelho Vitros® 5600 da Ortho Clinical Diagnostics (VITROS Chemistry Products), segundo as instruções do fabricante.

##### **4.9.1 Dosagem de Glicose, Colesterol, Creatinina e HDL**

As dosagens foram realizadas com Kits diagnósticos laboratoriais, empregando o método Enzimático oxidase/peroxidase.

##### **4.9.2 Dosagem de Triglicérides**

A dosagem de triglicérides realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o sistema lipase lipoproteica/glicerolquinase/glicerol-3-fosfato oxidase/peroxidase.

##### **4.9.3 Dosagem de TGP, TGO e Albumina Plasmática**

As dosagens foram realizadas com Kits diagnósticos laboratoriais, utilizando-se o método colorimétrico.

##### **4.9.4 Na dosagem de Proteína Total e Ureia**

As dosagens foram realizadas com Kits diagnósticos laboratoriais, utilizando-se o método microesferas de polímero.

##### **4.9.5 Na dosagem de Amilase**

As dosagens realizadas com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o método cinético.

#### **4.10 Determinação do efeito do Extrato da *A. turkestanica* no peso dos órgãos e tecidos**

Os órgãos baço, epidídimo, fígado, rins, testículos, vesícula seminal, tecidos adiposos periepididimal e perirrenal, além dos músculos quadríceps femural, tríceps sural, posterior da coxa foram dissecados após a eutanásia, pesados em balança analítica digital Filizola e o peso relativo de cada um foi expresso em g/100g de peso corporal do animal e fixados em formol tamponado para posterior análise histológica.

#### **4.11 Análise Estatística**

Para análise dos resultados foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism 7 for *Windows*, que foi utilizado também para a confecção dos gráficos. Inicialmente os dados foram avaliados quanto a Normalidade e Homogeneidade pelo teste D'Agostino e Pearson. Caso apresentassem distribuição normal, foram avaliados pelo teste One Way Anova com pós teste Bartlett e teste de comparação múltipla de Dunnett e os dados foram expressos em Média e Desvio Padrão. Para as condições de Normalidade e/ou Homogeneidade não atendidas, os dados foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn e neste caso os dados foram expressos em Mediana, Mínimo e Máximo. Todos os grupos foram comparados com o grupo controle.

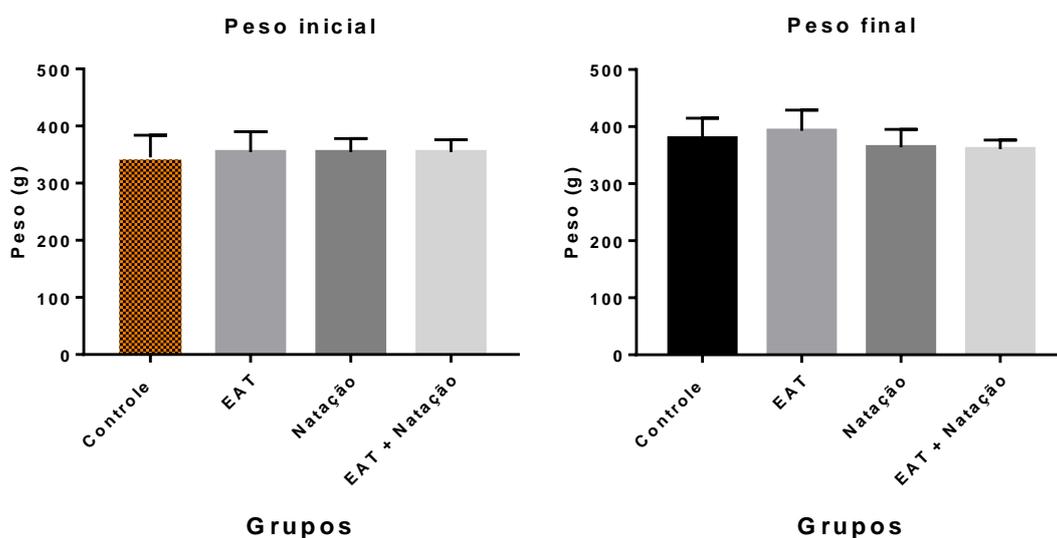
Em todos os casos o nível de significância para indicar diferença entre os grupos foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados obtidos quanto ao peso corporal e Índice de Lee

Ao final do experimento, observamos que os animais que foram submetidos ao exercício de natação, bem como aqueles submetidos ao exercício de natação associado à administração do extrato de *A. turkestanica* (EAT), tiveram uma pequena redução no peso corporal em relação ao grupo controle, porém sem significância estatística ( $p > 0,05$ ), como mostrado na Figura 7. A Tabela 1 sumariza os dados de peso e Índice de Lee.

**Figura 7:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação no peso dos animais.



Fonte: Dados da pesquisa

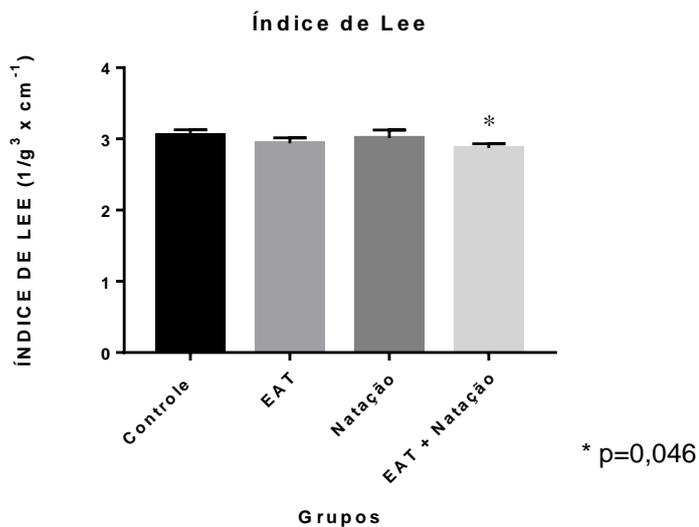
**Tabela 1.** Peso dos animais e Índice de Lee ao final do experimento (em gramas). Os dados foram analisados com os testes D'Agostino e Pearson e One Way Anova. Para distribuição normal, pós teste Bartlett's e teste de comparação múltipla de Dunnett.

	Controle	Turkesterona	Natação	Nat. + TK
Peso inicial (g)	345 ( $\pm 38$ )	354 ( $\pm 36$ )	355 ( $\pm 24$ )	354 ( $\pm 22$ )
Peso final (g)	379 ( $\pm 36$ )	393 ( $\pm 36$ )	364 ( $\pm 31$ )	361 ( $\pm 16$ )
Índice de Lee	3,1( $\pm 0,07$ )	2,9( $\pm 0,07$ )	3,0( $\pm 0,11$ )	2,9*( $\pm 0,05$ )

Fonte: Dados da pesquisa (\*  $p < 0,05$ )

Ao analisarmos o Índice de Lee, observamos que os animais que receberam EAT associado com o exercício de natação apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, como mostrado na Figura 8 ( $p < 0,05$ ).

**Figura 8:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação no Índice de Lee dos animais.



Fonte: Dados da pesquisa

## 5.2 Resultados obtidos quanto ao peso dos órgãos e tecidos

Os valores dos parâmetros anatômicos estão sumarizados na Tabela 2, onde se observa que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados.

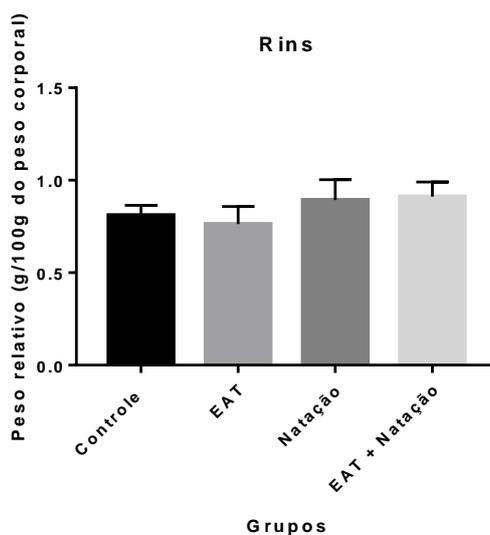
**Tabela 2: Peso relativo dos órgãos (g/100g de peso corporal) ao final do experimento. Os dados foram analisados com os testes D'Agostino e Pearson e One Way Anova. Para distribuição normal, pós teste Bartlett's e teste de comparação múltipla de Dunnett. Para distribuição não normal, teste Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.**

Órgão/tecido	Controle	EAT	Natação	Natação + EAT
Baço	0,24 (±0,04)	0,24 (±0,02)	0,28 (±0,06)	0,29 (±0,05)
Epidídimo	0,18 (±0,02)	0,17 (±0,02)	0,20 (±0,02)	0,21 (±0,02)
Fígado	3,06 (±0,35)	2,97 (±0,17)	3,36 (±0,57)	3,59 (±0,37)
Músculo Posterior da Coxa	2,32 (±0,32)	2,16 (±0,36)	2,56 (±0,39)	2,68 (±0,38)
Músculo Quadríceps	1,05 (0,94-1,1)	1,09 (0,99-1,55)	1,12 (1,02-1,62)	1,13 (0,45-1,45)
Músculo Tríceps Sural	0,68 (±0,03)	0,68 (±0,03)	0,73 (±0,15)	0,77 (±0,07)
Rins	0,81 (±0,05)	0,76 (±0,09)	0,89 (±0,11)	0,91 (±0,07)
Tecido Adiposo Periepididimal	2,54 (±0,42)	2,57 (±0,22)	2,11 (±0,49)	2,10 (±0,42)
Tecido Adiposo Perirrenal	2,38 (1,75-2,98)	2,24 (1,49-3,42)	1,46 (0,68-2,74)	1,60 (1,17-2,93)
Testículos	1,1 (0,99-1,2)	1,1 (0,85-1,1)	1,1 (0,72-1,3)	1,2 (0,97-1,2)
Vesícula Seminal	0,36 (±0,07)	0,34 (±0,06)	0,47 (±0,13)	0,41 (±0,07)

Fonte: Dados da pesquisa (p>0,05)

No peso dos rins não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao grupo controle, mas pode-se observar um aumento no peso nos grupos que fizeram natação associada ou não ao EAT (Figura 9).

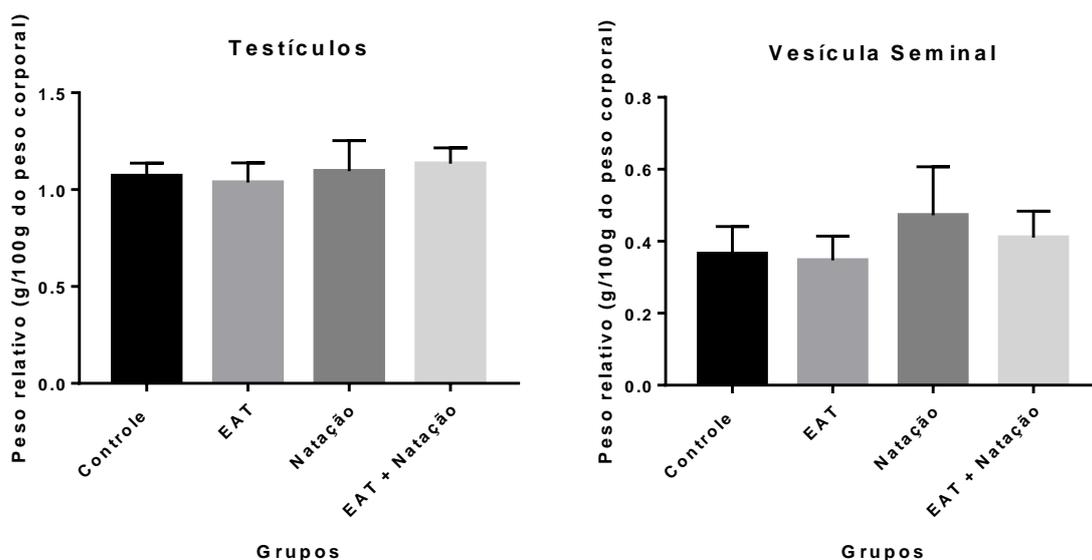
**Figura 9: Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação no peso dos rins dos animais**



Fonte: Dados da pesquisa

Para peso dos testículos, não houve diferença significativa dos grupos em relação ao grupo controle. Para o peso da vesícula seminal, embora tenha sido observado um aumento nos animais submetidos ao exercício de natação, este não foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (Figura 10).

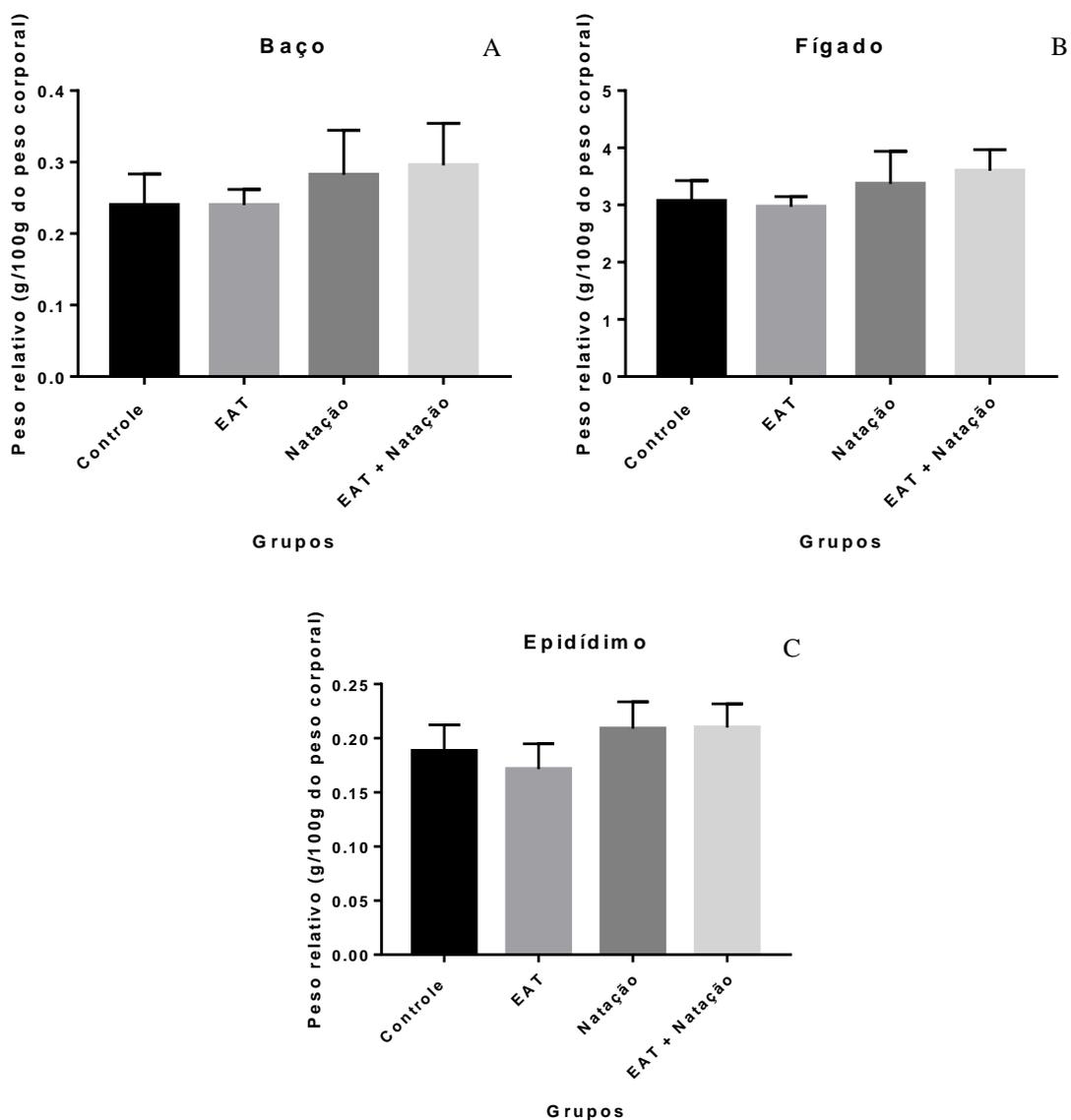
**Figura 10:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação no peso dos testículos e da vesícula seminal.



Fonte: Dados da pesquisa

No peso do baço, fígado e epidídimo, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao grupo controle, porém, observamos um aumento nos grupos que fizeram natação e nos grupos que fizeram natação e receberam EAT (Figura 11 A, B e C).

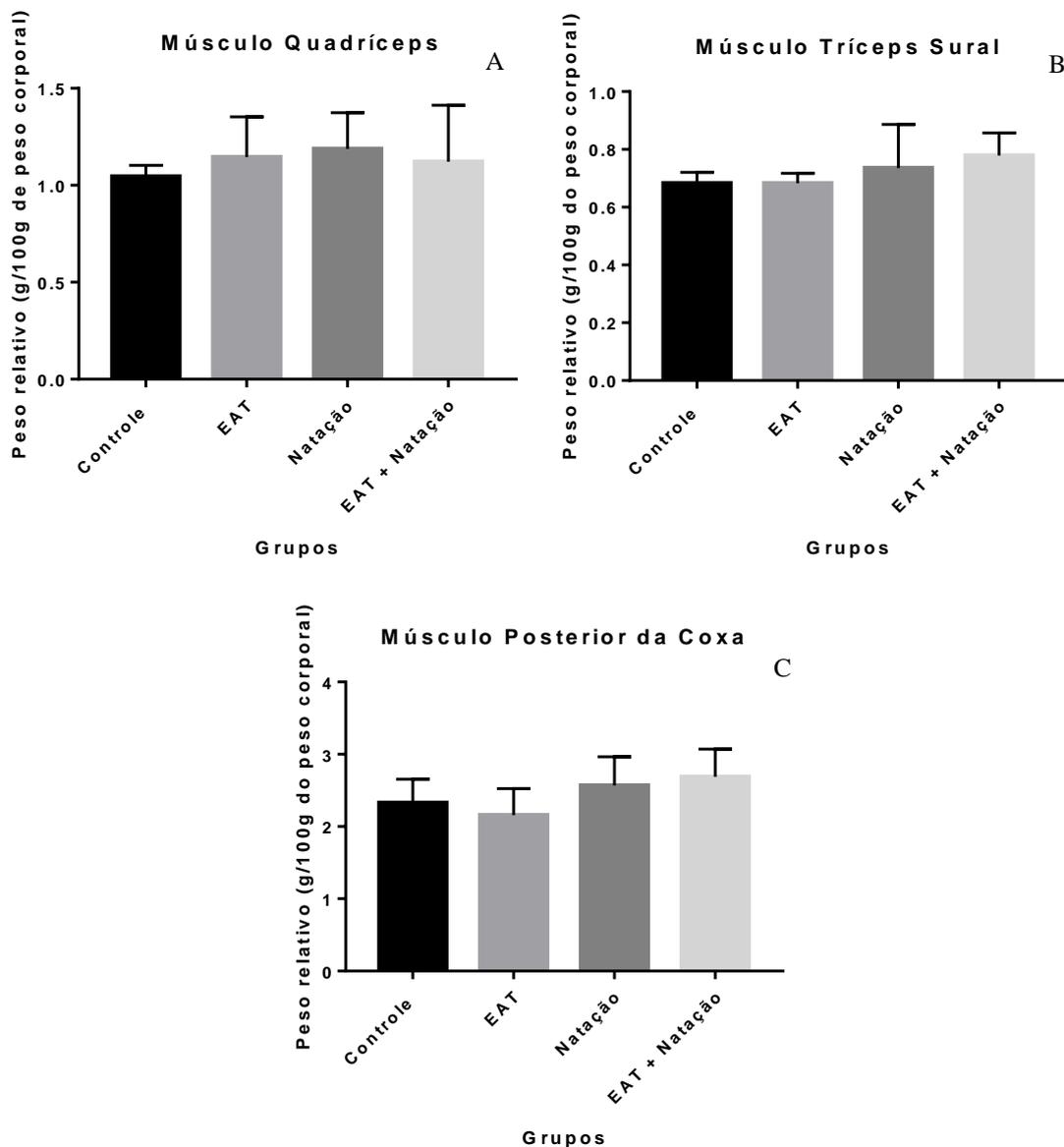
**Figura 11:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação no peso do Baço (A), Fígado (B) e Epidídimo (C).



Fonte: Dados da pesquisa

Para o peso dos músculos quadríceps femural, tríceps sural e posterior da coxa, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao grupo controle, porém, houve um aumento nos pesos respectivos nos grupos que fizeram natação associado ou não ao EAT (Figura 12 A, B e C).

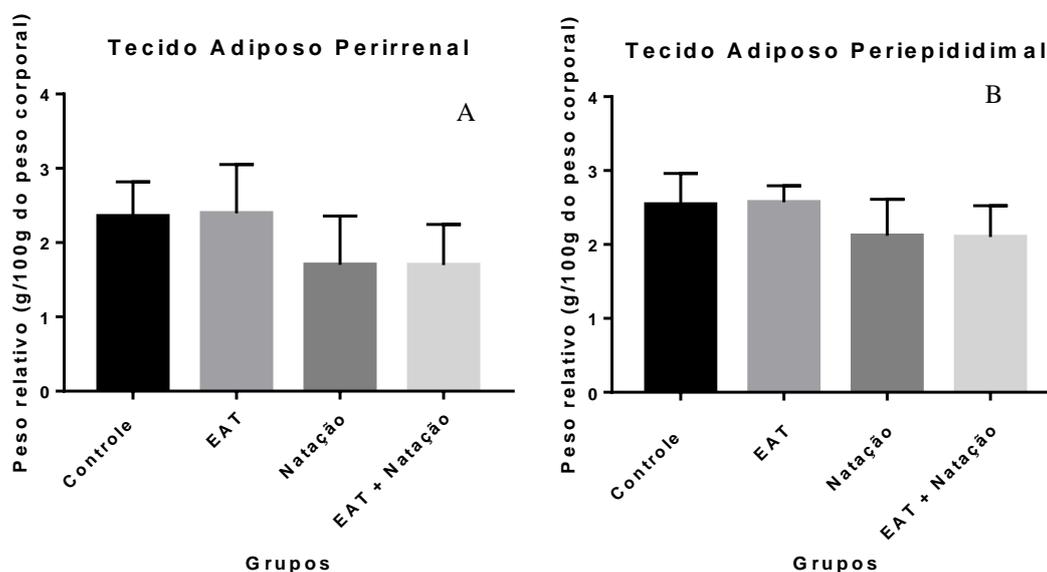
**Figura 12:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação no peso dos Músculos Quadríceps (A), Tríceps Sural (B) e Posterior da Coxa (C).



Fonte: Dados da pesquisa

Podemos observar uma diminuição do peso dos tecidos adiposos perirrenal e periepididimal nos grupos que realizaram natação e nos grupos que realizaram natação e fizeram uso de EAT, porém, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 13 A e B).

**Figura 13:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação no peso dos tecidos adiposos perirrenal (A) e periepididimal (B).



Fonte: Dados da pesquisa

### 5.3 Resultados obtidos nas análises das Dosagens Bioquímicas

A administração do EAT não levou a alteração significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. Sua associação com a natação levou a redução dos níveis de Triglicérides e Colesterol total, enquanto a natação (sozinha ou associada ao EAT) promoveu também redução dos níveis de HDL. Os valores do perfil bioquímico estão sumarizados na Tabela 3.

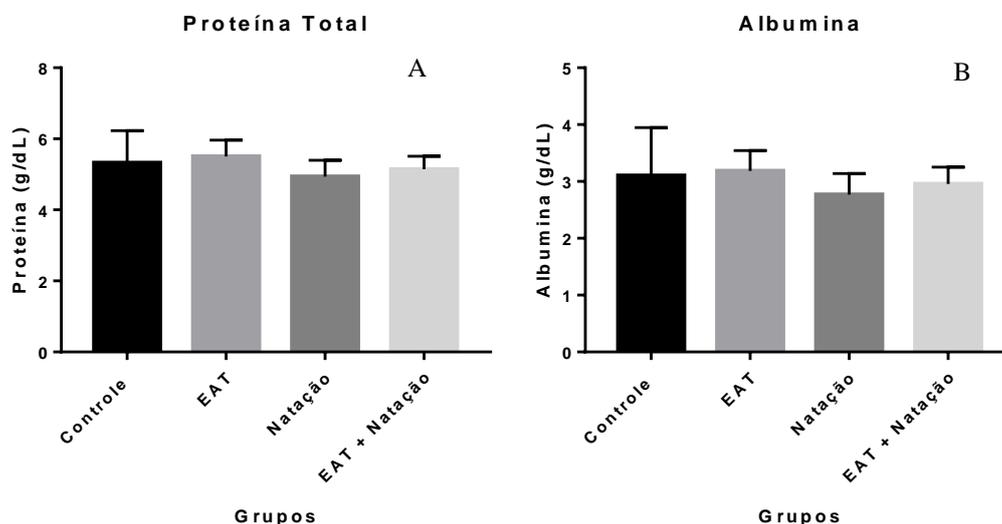
**Tabela 3: Perfil Bioquímico dos ratos após o tratamento com EAT associado ou não ao exercício de natação. Os dados foram analisados com os testes D'Agostino e Pearson, teste One Way Anova e para distribuição normal, pós teste Bartlett's e teste de comparação múltipla de Dunnett e para distribuição não normal, teste Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.**

Analito	Controle	EAT	Natação	Natação + EAT.
Glicose	113 (110-159)	137 (109-248)	104 (41-134)	105 (42-133)
Proteína Total	5,3 (±0,91)	5,5 (±0,46)	4,9 (±0,46)	5,1 (±0,36)
Albumina	3,1 (±0,84)	3,1 (±0,36)	2,7 (±0,37)	2,9 (±0,29)
Triglicérides	67 (±13,45)	68 (±23,69)	56,8 (±12,43)	42* (±11,39)
Amilase	1315 (±407,2)	1511 (±289,9)	1187 (±191,8)	1135 (±200,4)
Creatinina	0,64 (±0,20)	0,55 (±0,08)	0,58 (±0,07)	0,55 (±0,08)
Uréia	45,4 (±4,93)	47,6 (±4,80)	45,8 (±6,31)	47,2 (±3,66)
TGO	85 (67-113)	63 (62-85)	94 (76-160)	98 (68-591)
TGP	44 (43-76)	46 (41-59)	60 (48-88)	53 (40-306)
HDL	50,2 (±12,44)	48,3 (±4,80)	36,6* (±4,38)	38,7* (±3,89)
Colesterol Total	61,12 (±28,62)	54,92 (±9,83)	44,31 (±13,52)	40,59* (±4,17)

Fonte: Dados da pesquisa (\* p<0,05)

Nas dosagens de proteína total e albumina, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao grupo controle (Figura 14 A e B).

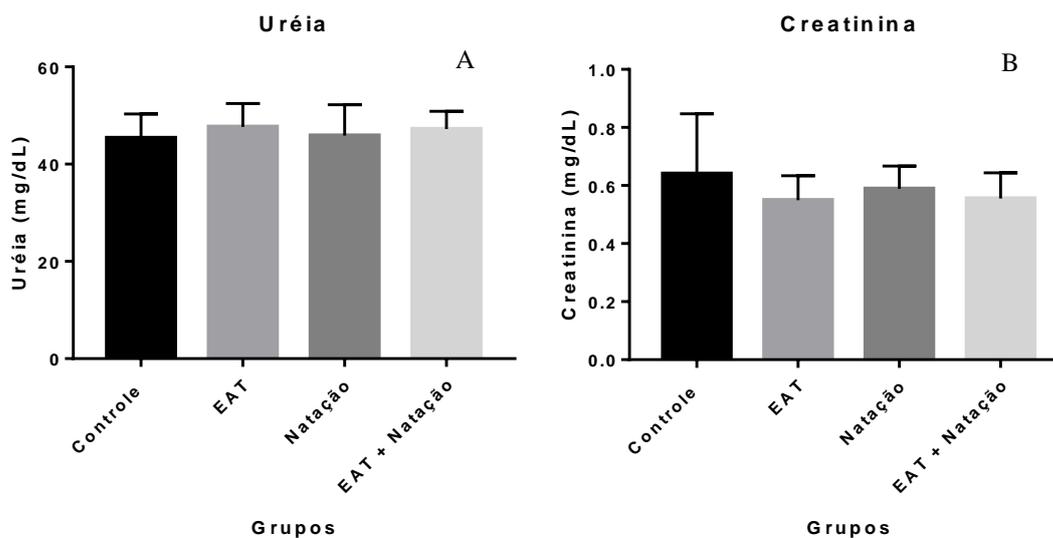
**Figura 14:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação nos parâmetros de Proteína Total (A) e Albumina (B).



Fonte: Dados da pesquisa

Nos parâmetros ureia e creatinina, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao grupo controle (Figura 15 A e B).

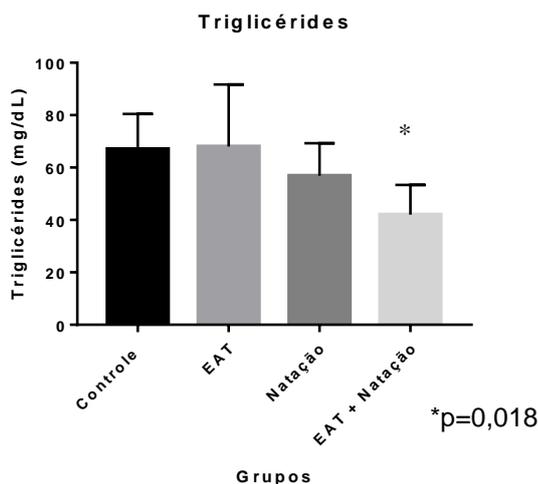
**Figura 15:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação nos parâmetros Ureia (A) e Creatinina (B).



Fonte: Dados da pesquisa

Nos grupos que realizaram natação e fizeram uso de EAT, a redução nos níveis de triglicérides foi de 37,31%, apresentando diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). E houve uma redução nos níveis do grupo que realizou natação (15,22%), porém sem diferença estatística (Figura 16).

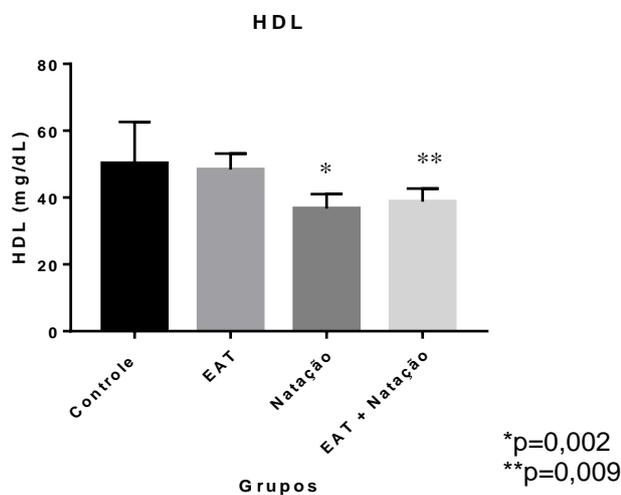
**Figura 16:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação nos níveis de triglicérides.



Fonte: Dados da pesquisa

Nos resultados do HDL observa-se uma redução nos grupos que realizaram natação em 27,09%, e nos grupos que realizaram natação e fizeram o uso de EAT, a redução foi de 22,90% em relação ao grupo controle, ambos com diferenças estatísticas significativas (Figura 17).

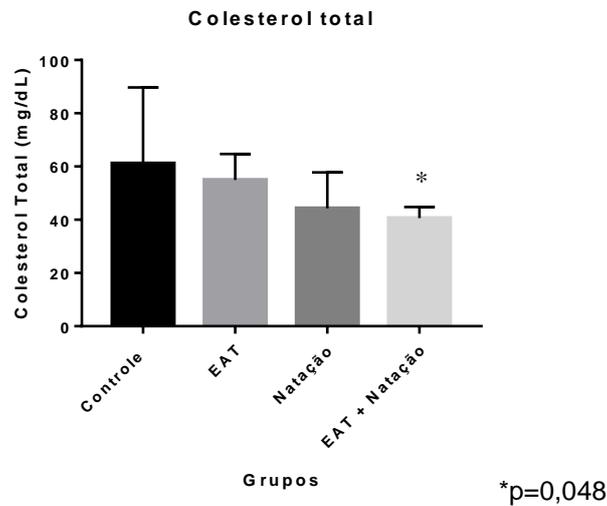
**Figura 17:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação nos níveis de HDL.



Fonte: Dados da pesquisa

Nos resultados de colesterol total, os grupos que realizaram natação, apresentou uma redução em relação ao grupo controle (27,50%), porém, sem diferença estatística, e nos grupos que realizaram natação e fizeram uso de EAT a redução foi de 33,58% apresentando diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (Figura 18).

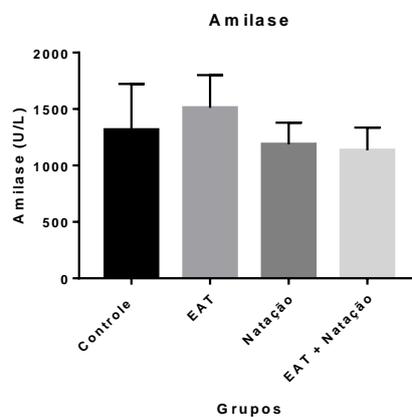
**Figura 18:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação nos parâmetros de Colesterol Total.



Fonte: Dados da pesquisa

Nos níveis de amilase, não houve diferença significativa dos grupos em relação ao grupo controle (Figura 19).

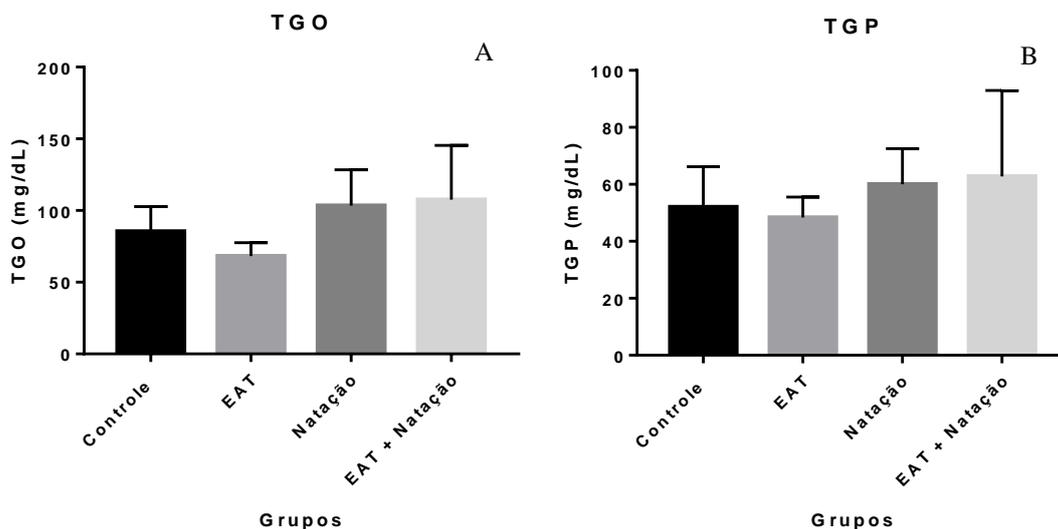
**Figura 19:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação nos parâmetros de Amilase.



Fonte: Dados da pesquisa

Nos índices de TGO e TGP houve um aumento entre os grupos que fizeram natação e receberam EAT, quando comparados com o grupo controle, porém sem significância estatística (Figura 20 A e B).

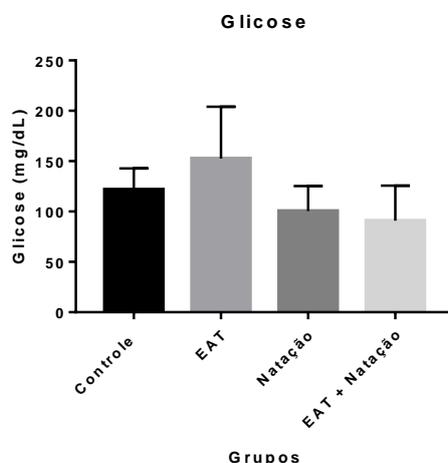
**Figura 20:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação nos parâmetros de TGO (A) e TGP (B).



Fonte: Dados da pesquisa

Para a dosagem de glicose, houve uma diminuição nos grupos que realizaram natação associado ou não ao EAT, quando comparadas com o grupo controle, porém sem significância estatística (Figura 21).

**Figura 21:** Efeito do EAT associado ou não com o exercício de natação na Glicose plasmática.



Fonte: Dados da pesquisa

Em resumo do perfil bioquímico, destacamos a redução significativa nos níveis de triglicérides (37,31%) e de colesterol total (33,58%) nos animais que foram tratados com EAT associado ao exercício de natação, em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e também para os níveis de HDL, que foram reduzidos tanto no grupo que recebeu apenas o treinamento de natação (27,09%) quanto nos animais que receberam o extrato associado ao exercício de natação (22,90%) ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Para os grupos que receberam apenas o EAT, associado ou não com o exercício de natação, não houve alteração significativa em relação ao peso final, quando comparado com o grupo controle. No estudo de Bellocchio (2016), esse mesmo extrato não foi capaz de induzir perda de massa gorda em ratos obesos, bem como foi observado por Wilborn et al (2006), que ofereceram ecdisterona (da qual a turkesterona é um análogo estrutural), durante 8 semanas a um grupo de homens adultos treinados e também não encontrou alteração nas variáveis massa gorda, massa magra e percentual de gordura corporal, apesar da manutenção da rotina de treinamento.

O efeito observado no Índice de Lee se manifestou apenas quando houve a associação do EAT com a natação, o que pode ser um indício de que o extrato potencialize os efeitos do exercício no que diz respeito à redução da massa corporal. Nossos resultados diferem marcadamente dos obtidos por Syrov (2000), que observou um aumento significativo no peso corporal de ratos após administração, também via gavagem, de vários fitoecdisteroides purificados (5mg/Kg peso corporal) inclusive a turkesterona, durante 10 dias. Nossos resultados diferem também dos obtidos por Chermnykh et al (1988) que observaram efeito anabólico induzido pela 20-hidroxiecdisona em camundongos submetidos à natação, sendo esse efeito, inclusive, independente do treinamento prévio com a natação, situação necessária para o efeito anabolizante induzido pela metandrostenediona, um esteroide anabólico. Dessa forma, os nossos dados indicam que o efeito sobre o peso não foi significativo e sugerem que a diferença observada foi devido ao exercício mais do que ao EAT.

Quanto aos parâmetros anatômicos, observamos uma pequena redução, embora não significativa do ponto de vista estatístico, no peso relativo dos tecidos adiposos analisados (periepídidimal e perirrenal). Essa redução, no entanto, foi associada ao exercício de natação e não exclusivamente à administração do EAT, conforme outros autores já demonstraram (BERNARDES et al, 2004). Catalán et al. (1985) sugeriram que a ecdisterona causa uma redução na biossíntese de lipídios e impede o funcionamento adequado da enzima triacilglicerol-lipase, responsável pela degradação de TAG no adipócito e também no hepatócito.

Quanto aos demais órgãos, o que se observou foi um ligeiro aumento no peso relativo, porém nenhum significativo do ponto de vista estatístico. Nem mesmo para os três músculos analisados (Quadriceps, Tríceps Sural e Posterior da Coxa) foi observado aumento significativo seja pela natação ou pelo EAT. Esses dados sugerem mais uma vez que o EAT não está exercendo seu efeito anabólico esperado, pois há

inúmeros estudos na literatura que mostram essa ação anabólica em cultura de células (GORELICK-FELDMAN et al, 2008; ZUBELDIA et al, 2012; PARR et al, 2014) e também em animais (SYROV, 2000; CHENG et al, 2013; TÓTH et al, 2008). No entanto, esses estudos utilizaram o extrato parcialmente purificado (GORELICK-FELDMAN et al, 2008; ZUBELDIA et al, 2012; PARR et al, 2014) ou purificado (SYROV, 2000; TÓTH et al, 2008) e, em alguns casos a administração foi feita por infusão contínua (CHENG et al, 2013) ou subcutânea (TÓTH et al, 2008).

A 20-hidroxicdisona induziu um acréscimo de massa no músculo tríceps braquial de ratos, porém esse efeito foi obtido por meio da infusão contínua do produto purificado (5mg/Kg/dia) e, mesmo assim, a suplementação não afetou outros músculos nem outros parâmetros fisiológicos. Nesse caso específico, foi observado também a alteração na expressão de 16 genes envolvidos com os sistemas muscular e esquelético no músculo tríceps braquial, permitindo concluir que apesar de não ter efeito sistêmico e geral no organismo dos animais estudados, a 20-hidroxicdisona pode causar mudança na expressão gênica de um músculo específico (CHENG et al, 2013).

A capacidade dos (fito)ecdisteriodes induzirem a síntese proteica é bastante estudada, especialmente em cultura de células musculares (GORELICK-FELDMAN et al, 2008; ZUBELDIA et al, 2012). Tal capacidade poderia sugerir a hipótese de que os animais que receberam EAT e até mesmo aqueles que receberam EAT associado com natação pudessem ter uma elevação em alguns parâmetros anatômicos. No entanto, como já foi mencionado, não observamos nenhum efeito devido a administração do EAT. Os valores numericamente maiores (porém sem significância estatística) para o peso relativo de alguns órgãos e tecidos tais como fígado, vesícula seminal, rins e epidídimo foram associados ao exercício de natação, estando este associado ou não ao EAT.

Na análise bioquímica, houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do colesterol total (33,58%) e nos triglicérides (37,31%) dos animais que realizaram natação e receberam EAT, em relação ao grupo controle. Esse efeito pode ser explicado com base no estudo de Catalán et al, (1985) no qual a ecdisterona levou a uma redução na biossíntese de lipídios e impede o funcionamento adequado da enzima triacilglicerol-lipase, responsável pela degradação de TAG no adipócito e também no hepatócito. Esses autores observaram o efeito em ratos tratados com ecdisterona sem a realização de exercícios. Báthori et al (2008) relata que após a administração diária de 20-hidroxicdisona na dose de 2,5 mg/kg para os animais com hipercolesterolemia em 3, 6 e 8 semanas, o nível de colesterol no plasma sanguíneo diminuiu em 7%; 16,9% e 29%, respectivamente. No nosso estudo, os animais tratados exclusivamente com

EAT não mostraram redução significativa em relação ao grupo controle, sugerindo que mesmo doses menores de fitoecdisteroides podem se tornar efetivas se associadas ao exercício.

Ainda quanto aos parâmetros bioquímicos, não foi observado diferença estatística nos níveis de glicemia, parâmetro que foi afetado no estudo de Kutepova et al (2001), que estudou o efeito de um extrato total de *A. turkestanica* (5mg/Kg durante 30 dias) na glicemia de ratos induzidos ao diabetes com Aloxano e também no estudo de Chen, Xia e Qiu (2005) que estudaram a capacidade da ecdisterona em induzir o consumo de glicose por hepatócitos. Nos dois estudos, no entanto, trabalhou-se com doses de glicose acima do fisiológico, não havendo na literatura estudos que demonstrem que algum (fito)ecdisteroide seja capaz de reduzir a glicemia de ratos normoglicêmicos. Observe-se que a redução nos níveis de glicose plasmática ocorreu nos animais que foram submetidos ao exercício, associado ou não ao EAT. Isso se justifica pois é conhecido o efeito da atividade física nesse parâmetro.

Os níveis da lipoproteína de alta densidade total (HDL) foram reduzidos nos animais submetidos ao exercício de natação, quer ele estivesse ou não associado ao uso de EAT. Nos estudos de Tanaka (1997), a lipoproteína de alta densidade total (HDL) e de baixa densidade (LDL) não foram alteradas significativamente em ratos submetidos ao treinamento de natação, independente da frequência e intensidade utilizadas. Buck (1989), mostrou que exercício de natação não exibiu nenhum efeito nas concentrações de colesterol ou HDL em ratos. No entanto, no presente estudo, a redução que foi causada pela natação no colesterol total (aproximadamente 28%) fez restar praticamente apenas o colesterol HDL (84% do colesterol total nos animais submetidos ao exercício de natação). Isso sugere que a redução dos níveis de colesterol total induzidos pela natação, foi tão intenso que acabou por interferir nos níveis de HDL.

Na análise bioquímica também observamos elevação (embora não significativa) dos níveis de TGO e TGP nos animais submetidos ao exercício de natação (associado ou não ao uso do EAT). Isso pode refletir os danos celulares ao tecido muscular induzidos pelo exercício.

A quantidade de turkesterona indicada na bula do fabricante é de 2%. Considerando a dose de 36mg/Kg de peso corporal do rato e que os ratos tinham em média 350g, calcula-se a administração de 0,25 mg de turkesterona por animal, um valor muito abaixo daquele que é utilizado nos estudos que avaliam a eficácia dos (fito)ecdisteroides. No entanto essa dosagem foi utilizada porque esta que é quantidade recomendada pelo fabricante para a utilização por seres humanos (500 a 2000mg/dia para um adulto de 70Kg). Além disso, a meia vida plasmática da

turkesterona e (possivelmente dos ecdisteroides de maneira geral) é bastante curta, ficando ao redor de 8 minutos para a 20-hidroxiecdisterona (LAFONT e DINAN, 2003), fato que colabora para explicar a ausência de efeitos.

De maneira geral, a falta de efeito observado para o EAT sugere que a quantidade de princípios ativos (fitoecdisteroides de maneira geral) está insuficiente nesse produto comercial, a ponto de não induzir o efeito observado por vários autores quando utilizaram compostos parcial ou totalmente purificados.

## **7. CONCLUSÃO**

O EAT não foi capaz de induzir efeitos metabólicos que se manifestassem no peso dos animais ou de seus órgãos.

A natação, associada ao EAT levou a uma redução significativa nos níveis de triglicérides e de colesterol total plasmáticos.

A dosagem de EAT recomendada para seres humanos provavelmente está abaixo da dosagem mínima efetiva para a obtenção de algum efeito anabólico.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABDUKADIROV, I. T. et al. Ecdysterone and Turkesterone in *Ajuga turkestanica* determined by HPLC. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 41, n. 4, 2005, p.475-476. Doi: [10.1007/s10600-005-0184-x](https://doi.org/10.1007/s10600-005-0184-x).
- AZEVEDO, Andréa Pires et al. Dismorfia muscular: A busca pelo corpo hiper musculoso. **Motricidade**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.53-66, 1 mar. 2012. Desafio Singular, Lda. [http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.8\(1\).240](http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.8(1).240).
- BATHORI, Maria et al. Phytoecdysteroids and Anabolic-Androgenic Steroids - Structure and Effects on Humans. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.75-91, 1 jan. 2008. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986708783330674>.
- BELLOCCHIO, Anna Laura. **Efeito da Turkesterona no metabolismo de ratos obesos**. 2016. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odonto, Universidade de Uberaba, Uberaba, 2016.
- BERNARDES, D. et al. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. **Revista Brasileira de Educação Física no Esporte**, São Paulo, v.18, n.2, p.191-200, abr./jun. 2004.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D.. CORRELATION BETWEEN 'LEE INDEX' AND CARCASS FAT CONTENT IN WEANLING AND ADULT FEMALE RATS WITH HYPOTHALAMIC LESIONS. **Journal Of Endocrinology**, [s.l.], v. 40, n. 4, p.527-528, abr. 1968. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.0400527>
- BRITO, A.f. et al. Intensity of swimming exercise influences aortic reactivity in rats. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 48, n. 11, p.996-1003, 18 set. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20154397>.
- BUCK, E. E. et al. Influence of exercise and cholesterol feeding on lipids and lipoproteins in rats. **J Sports Med Phys Fitness**, 1989 Mar;29(1):71-76.
- CATALÁN, R.E. et al. Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.771-775, jan. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(85\)90403-1](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(85)90403-1).
- CHAKRABORTY, Sandipan; BASU, Soumalee. Dual inhibition of BACE1 and A $\beta$  aggregation by  $\beta$ -ecdysone: Application of a phytoecdysteroid scaffold in Alzheimer's disease therapeutics. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 95, p.281-287, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.061>.
- CHEN, Qiu; XIA, Yongpeng; QIU, Zongyin. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro. **Life Sciences**, [s.l.], v. 78, n. 10, p.1108-1113, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.06.031>
- CHENG, Diana M. et al. Continuous Infusion of 20-Hydroxyecdysone Increased Mass of Triceps Brachii in C57BL/6 Mice. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.107-111, 12 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4679>.

CHERMNYKH, N. et al. The action of mehandrostenolone and ecysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles. **Farmakol Toksikol**, v. 51, p.57–60, nov 1988.

DIMAURO, J.; BALNAVE, R. J.; SHOREY, C. D.. Effects of anabolic steroids and high intensity exercise on rat skeletal muscle fibres and capillarization. **European Journal Of Applied Physiology And Occupational Physiology**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.204-212, 1992. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00626282>.

FILHO, J. C. S. C. et al. Efeitos do esteroide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v. 12, n. 5, 2006.

GORELICK-FELDMAN, Jonathan et al. Phytoecdysteroids Increase Protein Synthesis in Skeletal Muscle Cells. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 10, p.3532-3537, maio 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf073059z>.

GORELICK-FELDMAN, Jonathan Isaac. Phytoecdysteroids understanding their anabolic activity. 2009. 151 f. Tese (Doutorado) - Curso de Philosophy, New Brunswick Rutgers, New Jersey, 2009.

GORELICK-FELDMAN, Jonathan; COHICK, Wendie; RASKIN, Ilya. Ecdysteroids elicit a rapid Ca<sup>2+</sup> flux leading to Akt activation and increased protein synthesis in skeletal muscle cells. **Steroids**, [s.l.], v. 75, n. 10, p.632-637, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2010.03.008>.

GUIBOUT, Louis et al. The minor ecdysteroids from *Ajuga turkestanica*. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.293-300, 8 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2563>.

IRIART, J. A. B. et al. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 25 n. 4, p.773-782, abril de 2009.

KUTEPOVA, T. A. et al. Hiplogycemic activity of the total ecdysteroid extract from *Ajuga Turkestanica*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, [s.l.], v. 35, n. 11, p.608-609, 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1015145811009>.

LAFONT, R.; DINAN, L.. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: and update. **Journal Of Insect Science**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.3-7, 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jis/3.1.7>.

MELLO, M. T. et al. O exercício físico e os aspectos psicobiológicos. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v. 11, n. 3, Mai/Jun. 2005.

NIDA (The National Institute on Drug Abuse), 2001. *Research Report Series. Anabolic Steroids Abuse*. Washington, DC: NIDA

PARR, Maria Kristina et al. Estrogen receptor beta is involved in skeletal muscle hypertrophy induced by the phytoecdysteroid ecysterone. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s.l.], v. 58, n. 9, p.1861-1872, 27 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201300806>.

PARR, Maria et al. Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents?. **Biology Of Sport**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.169-173, 30 dez. 2014. Index Copernicus. <http://dx.doi.org/10.5604/20831862.1144420>.

RAMAZANOV N. Sh.. Phytoecdysteroides and other biologically active compounds from plants of the genus *Ajuga*. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 41, n. 4, 2005, p.361-369. Doi: [10.1007/s10600-005-0153-4](https://doi.org/10.1007/s10600-005-0153-4).

ROCHA, F. L. et al. Esteroides anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular. **O MUNDO DA SAÚDE**, v. 31, n. 4, p.470-477, out/dez 2007, São Paulo.

SYROV, V. N.. Comparative experimental investigation of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranabols. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.193-197, abr. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02524596>.

TANAKA, H. et al. Effects of swim training on body weight, carbohydrate metabolism, lipid and lipoprotein profile. **Clinical Physiology**. v. 17, n. 4, p.347-359, Jul. 1997. Oxford, England.

TÓTH, Noémi et al. 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.691-698, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2008.04.015>.

VARGAS, E. G. A. A influência da mídia na construção da imagem corporal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 29, n. 1, 2014, p.73-75.

WILBORN, Colin 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**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.19-27, dez. 2006. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1186/1550-2783-3-2-19>.

ZUBELDIA, José M. et al. In Vitro Characterization of the Efficacy and Safety Profile of a Proprietary *Ajuga Turkestanica* Extract. **Chinese Medicine**, [s.l.], v. 03, n. 04, p.215-222, 2012. Scientific Research Publishing, Inc., <http://dx.doi.org/10.4236/cm.2012.34031>

## 9. ANEXOS



Ofício CEEA-027/2018

Uberaba, 29 de junho de 2018

Ilmo. Prof.

**Geraldo Thedei jr**

**Assunto:** Encaminha processo nº 016/2018, sobre o protocolo de pesquisa "Efeito da Turkesterona no metabolismo de ratos Wistar adultos submetidos ao treinamento de natação".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 25/06/2018, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jocely F. Bittar".

*Profa. Jocely F. Figueiredo Bittar*

Coordenadora do CEEA-UNIUBE



## LAUDO DE ANÁLISES

### TURKESTERONA

Cliente - FARMACIA ACQUA BELLA EIRELLI EPP  
Quantidade - 1,000 KG  
Data de Fabricação - 08/08/2014  
Data de Validade - 08/08/2016  
Lote Interno - AUTO063585

Nota Fiscal - 056601 12/09/2014

Lote do Fornecedor - 20140808  
Procedência - CHINA

Nome Químico/ou Botânico - AJUGA L.  
Classe Terapêutica - SUPLEMENTAÇÃO ESPORTIVA  
Peso Molecular - N/A  
DCB - NA

Fórmula Molecular - N/A  
CAS - N/A

ARMAZENAR EM TEMPERATURA ENTRE 15°C E 30°C E UMIDADE RELATIVA DO AR ENTRE 40% E 75%  
ACONDICIONAR EM RECIPIENTE HERMETICAMENTE FECHADO AO ABRIGO DA LUZ DIRETA EM LOCAL SECO E AREJADO

(*)	Análise / Componentes	Especificações	Resultados das Análises
<b>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b>			
	*APARÊNCIA	PÓ FINO MARROM	CONFORME
	*PERDA POR SECAGEM	< OU = 5.0%	3,1%
	*CINZAS	< OU = 5.0%	2,34%
	*GRANULOMETRIA	100% PASSA EM MALHA 80	CONFORME
	*SOLUBILIDADE	SOLÚVEL EM ETANOL	CONFORME
	*METAIS PESADOS	< OU = 10 PPM	CONFORME
	*ARSÊNIO	< OU = 2 PPM	CONFORME
	*CHUMBO	< OU = 2 PPM	CONFORME
	*BHC	< OU = 0.2 PPM	CONFORME
	*DDT	< OU = 0.2 PPM	CONFORME
	*PCNB	< OU = 0.1 PPM	CONFORME
	*SOLVENTE RESIDUAL	< OU = 5000 PPM	CONFORME
	*AFLATOXINAS	< OU = 0.5 PPM	CONFORME
	*TEOR DE TURKESTERONES (HPLC)	> OU = 2.0%	2,01%
	*CONTAGEM TOTAL DE MICROBACTERIA	< OU = 1000 UFC/G	CONFORME
	*FUNGOS E LEVEDURAS	< OU = 100 UFC/G	CONFORME
	*PRESENÇA DE ESCHERICHIA COLI	NEGATIVO	NEGATIVO
	*ESTAFILOCOCCOS	NEGATIVO	NEGATIVO
	*SALMONELLA	NEGATIVO	NEGATIVO
	*ESPECIFICAÇÕES E RESULTADOS DE ACO RDO COM FABRICANTE		

Especificações e resultados de acordo com o Fabricante/Fornecedor

### CONCLUSÃO(X) APROVADO

Informação Técnica - (\*) Os ensaios assinalados foram realizados pelo controle de qualidade do Fabricante/Fornecedor.

Juan Carlos de Souza  
Responsável Técnico  
CRF-GO 30301

Documento assinado eletronicamente.

IDEALFARMA IND. E COM. PROD. FARM. LTDA

RUA 09, QD 13-C MODULO 7 E 8-DAIA-ANAPOLIS - GO - 75113600 - Fone (62)3316-1288 - Fax (62) 3937-8658