



**ENSAIOS BIOLÓGICOS DO ALMEIRÃO-ROXO (*CICHORIUM INTYBUS L.*) E BARBATIMÃO (*STRYPHNODEDRON BARBATIMAN MARTIUS*) EM RATAS COM MENOPAUSA CIRÚRGICA**

*BIOLOGICAL ASSAYS OF CHICORY (*CICHORIUM INTYBUS L.*) AND BARBATIMAN (*STRYPHNODEDRON BARBATIMAN MARTIUS*) IN RATS WITH SURGICAL MENOPAUSE*

**Ramirys C. Garcia<sup>1</sup>; Valquíria F. Louredo<sup>1</sup>; Wanessa C. Mattedi<sup>1</sup>; Robison P. Garcia Jr.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmicas do curso de Farmácia do Centro Universitário Vila Velha - UVV. Vila Velha-ES, Brasil;

<sup>2</sup>Docente do curso de Farmácia do Centro Universitário Vila Velha - UVV. Vila Velha-ES, Brasil.

E-mail do autor para correspondência: robisongarcia@yahoo.com.br

**Recebido em 02/07/2009 - Aceito em 19/02/2010**

**RESUMO:** Nos últimos anos, percebe-se um aumento no interesse por terapias alternativas. Como exemplo, tem-se a utilização dos fitoestrogênios, substâncias não-esteróides com atividade estrogênica, encontrados no almeirão-roxo (*Cichorium intybus L.*) e barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman Martius*), na tentativa de amenizar os sintomas que acometem as mulheres pós-menopausadas. Por isso, o objetivo desse estudo foi pesquisar e avaliar os efeitos hormonais de extratos alcoólicos obtidos a partir dessas plantas medicinais, que foram utilizados como terapia de reposição hormonal em ratas com menopausa cirúrgica. Estas foram divididas em quatro grupos: controle (CONT), castradas sem tratamento (CAST), castradas com tratamento de extrato alcoólico de almeirão-roxo (CTAA) e castradas com tratamento de extrato alcoólico de barbatimão (CTAB). Ao final do tratamento, foram considerados os parâmetros das análises em citologia esfoliativa, peso uterino e variação do peso corporal. O esfregaço foi fixado em metanol e corado pelo método panótico rápido LB. O útero foi retirado por histerectomia e submetido à obtenção do peso úmido em balança. O peso úmido foi corrigido pelo peso corporal para estimar a hipertrofia uterina. Os valores foram estudados pelo método de análise estatística "ANOVA", ao nível de probabilidade de 1 e 5% pelo teste *post-hoc* Fisher's. Os ensaios biológicos realizados mostraram ação estrogênica no epitélio cérvico-vaginal e na redução do peso corpóreo dos animais que foram tratados com os extratos, porém o peso uterino e a relação peso uterino/peso corporal (mg/g) não houve alteração significativa, o que demonstra ausência da ação estrogênica no útero.

**Palavras chaves:** Menopausa. Climatério, Ciclo Estrogênico

**ABSTRACT:** The interest in alternative therapies has been growing in the past few years. As an example, there is the use of phytoestrogens, non-steroid substances with estrogenic activity, found in chicory (*Cichorium intybus L.*) and barbatiman (*Stryphnodendron barbatiman Martius*) in an attempt to brighten up the symptoms that strike post-menopausal women. Therefore, the objective of this study was to research and evaluate the hormonal effects of alcoholic extracts retrieved from those plants which were used as hormone replacement therapy in rats that suffered surgical menopause. The rats were divided into four groups: control (CONT), neutered without treatment (CAST), neutered and treated with chicory alcoholic extract (CTAA) and neutered and treated with barbatiman alcoholic extract (CTAB). By the end of the treatment, were considered the parameters of analysis in exfoliative cytology, womb weight and body weight variation were analyzed. The smear was fixed in methanol and colored according to the LB fast panótico method. The uterus was removed through hysterectomy and subjected to wet weight measuring in a scale. The wet weight was corrected by body weight to stimulate uterine hypertrophy. The results were studied by the method of statistical analysis "ANOVA", in a 1 to 5% probability level by Fisher's *post-hoc* tests. The biological assays made showed estrogenic action in the vaginal skin and in the animal body weight reduction of those treated with with the extracts, yet no meaningful alterations concerning uterine weight and the uterine weight/body weight connection (mg/g), which demonstrates lack of estrogenic action in the womb.

**KEY WORDS:** Menopause. Climacteric. Estrous Cycle

## INTRODUÇÃO

A menopausa e o climatério passaram a ocupar um lugar de destaque na vida de muitas mulheres, uma vez que interferem negativamente em suas vidas.

O climatério, período da vida situado entre os 45 e 55 anos, é a fase de evolução biológica da mulher na qual ocorre o processo de transição do período reprodutivo para o não reprodutivo. Este é caracterizado por diversas mudanças endócrinas, devido ao declínio da atividade ovariana; biológicas, em função da diminuição da fertilidade; e clínicas, consequentes das alterações do ciclo menstrual, sendo que a menopausa, isto é, período quando cessam permanentemente as menstruações resultando da perda da atividade folicular ovariana, sendo um evento muito significativo (PEDRO, 2003).

Culturalmente, a menopausa representa um marco na determinação de mudanças na vida da mulher, inclusive em seu papel social. Por outro lado, propicia sintomas desconfortáveis e aumento na incidência de doenças (SANTOS & PEREIRA, 2007).

Segundo MEDEIROS *et al.* (2007), os principais sintomas associados ao climatério são vasomotores, nervosismo, diminuição da memória, fadiga, fogachos, insônia, depressão e atingem cerca de 60% das mulheres nessa fase. A atrofia urogenital e a osteoporose surgem após alguns anos. As defesas imunes naturais do organismo também são reduzidas em certa proporção por causa da fragilidade da pele e da diminuição da presença de anticorpos na mucosa, há ainda o aumento do risco de doenças cardiovasculares, uma vez que, a falta do estrogênio leva a alterações no perfil lipídico, em particular, aumento das

lipoproteínas de baixa densidade (LDL), redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aumento na deposição de gordura (TORREZAN *et al.*, 2008).

Há muitos anos esses sinais e sintomas vêm sendo tratados com a Terapia de Reposição Hormonal (TRH), quer seja somente com estrogênio ou associado a progesterona, a qual trouxe consigo a perspectiva teórica de manter as mulheres saudáveis, não osteoporóticas, menos cardiopatas, possivelmente lúbricas e belas, no entanto, os profissionais de saúde estão incertos em relação aos riscos/benefícios dessa terapia (PARDINI, 2007). Segundo NAHÁS *et al.* (2003), aproximadamente 70% das mulheres com terapia estrogênica, cessam o tratamento após o primeiro ano, devido ao sangramento irregular, mastalgia, náusea, cefaléia, retenção hídrica, ganho de peso corpóreo, além do medo do aumento de risco relativo de tromboembolismo e de neoplasias hormônio-dependentes, como no endométrio e na mama. Por essas razões, alguns autores estão investigando novos fármacos que possam oferecer os benefícios semelhantes ao estrogênio no climatério e por isso está crescendo o interesse em terapias alternativas como o uso dos fitoestrogênios, substâncias não-esteróides com atividade estrogênica, encontradas nas plantas, é o caso do almeirão (*Cichorium intybus L.*) e barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman Martius*), que vêm sendo utilizadas junto com outra planta medicinal, a amora-preta, pelas pastorais da saúde no tratamento de mulheres menopausadas, na tentativa de amenizar os sintomas que acometem essas mulheres nesse período. Conforme ALMEIDA (2003), esses

vegetais possuem inúmeras propriedades fitoterápicas extremamente importantes, além de atuarem como fitoestrogênios, possuem atividade antioxidante; inibem a proliferação e diferenciação de células malignas, atuando, dessa forma na prevenção e no combate de diversos cânceres, bem como possuem benefício no perfil lipídico e no metabolismo hepático, na diminuição da deposição de tecido adiposo e na proteção contra doenças cardiovasculares na pós-menopausa (TORREZAN *et al*, 2008), diminuindo os valores dos triglicerídeos e do LDL colesterol, além de serem excelentes fontes de fibras, proteínas insaturadas, vitaminas e minerais (ALMEIDA, 2003), trazendo assim, conseqüentemente, benefícios a essa mulheres.

Em relação ao uso popular, o barbatimão é utilizado como cicatrizante, antiinflamatório, hemostático, anti-séptico, antidiarréico, no tratamento de úlceras, hemorragias vaginais e gonorréia (CAMARGO, 1985) e o almeirão-roxo como laxante fraco, diurético, cicatrizante, para afecções do fígado, vesícula e rins. Quanto a toxicidade dos materiais vegetais utilizados (casca e folha) em humanos, pouco se conhece, sendo referidas alguns efeitos gastrointestinais leves, tais como, náusea e distensão abdominal (ALMEIDA, 2003).

Deste modo, os fitoestrogênios se apresentam como uma opção, quando a TRH for contra indicada, mas não podem ser indicados como primeira escolha, no tratamento da osteoporose estabelecida, nem para sintomas exarcebados da menopausa, já que a maioria dessas propriedades ainda não foram comprovadas cientificamente (ALMEIDA, 2003). No entanto, a comprovação é de suma importância, visto que, são produtos brasileiros,

de fácil acesso da população e relativamente de baixo custo. Segundo TRESVENZOL *et al.* (2006), as plantas medicinais podem ser a única terapia acessível para certas comunidades mais carentes e o conhecimento popular da eficácia desses vegetais podem contribuir com pesquisas, no que diz respeito à seleção das plantas para estudo. Portanto, este trabalho teve como objetivo pesquisar e avaliar os efeitos dos extratos obtidos das plantas medicinais barbatimão e almeirão-roxo, que foram utilizadas como terapia de reposição hormonal em ratas castradas, através de avaliação do útero e do esfregaço vaginal, bem como a variação do peso corporal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Características etnobotânicas

O barbatimão, *Stryphnodendron barbatiman* Martius, classe Magnoliatae, subclasse Rosidae, ordem Fabales, família Leguminosae, subfamília Mimosoidea (CAMARGO, 1985). É uma árvore que pode medir entre 4 e 6 metros, tendo cascas espessas, encurvadas, de forma e dimensões variáveis; superfície externa rugosa, fendilhada, castanho-esverdeada, ocasionalmente coberta de líquenes esbranquiçados; superfície interna estriada do sentido longitudinal, por vezes enrugada transversalmente, de cor vermelha-escurecida; fratura fibrosa. Inodoras e de sabor pouco amargo, mas nimamente adstringente. As folhas são alternas e compostas, onde os folíolos têm a forma mais ou menos arredondada e o número pode variar de 5 a 8 pares por folha. (COSTA, 2002). Já o almeirão-roxo, *Cichorium intybus* L., subclasse Asterida e ordem Asterales, família Compositae, subfamília Cichorioideae, é uma planta herbácea, de ciclo anual curto, cultivada em quase todas as

regiões do Brasil, atingindo de 50 centímetros de altura. Sua raiz é tuberosa longa e tem formato cônico, cujo carboidrato de reserva é a inulina. Suas folhas são verdes com nervuras aroxeadas, alongadas e estreitas, de superfície lisa recoberta de pêlos e desenvolvem-se formando uma roseta próxima ao solo.

### **Coleta e registro do material vegetal**

Segundo as características etnobotânicas, os materiais vegetais a serem avaliados foram adquiridos no comércio no dia 05/03/2009, em mercado do tipo horti-fruti e farmácia de fitoterápico no período matutino. Duas folhas de almeirão-roxo foram mantidas em estufa de desidratação vegetal por dois meses. As cascas do barbatimão, por já estarem secas, não foram necessário passar por esse processo. Após esse período, levaram-as para o Herbário UVV-ES, localizado no Biopráticas, onde foram catalogadas no dia 07/05/2009 às 17:37 e receberam número de registro, 1744 e 1743, respectivamente.

### **Obtenção dos extratos etanólicos**

Para a preparação dos extratos, as cascas e folhas foram separadas e cortadas em pedaços pequenos. Em seguida, foram pesadas 15 gramas da folha fresca do almeirão-roxo e adicionado 100ml de álcool etílico. O mesmo processo foi realizado para a casca do barbatimão.

Durante quatorze dias, os extratos foram agitados diariamente por um período de um minuto. Ao término das duas semanas foi realizada filtração a vácuo. Os extratos foram armazenados em vidro âmbar e rotulados, mantendo-os sob refrigeração.

### **Animais experimentais**

Foram utilizadas 28 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas com dois meses e com peso corporal variando entre 144 a 206 g que foram fornecidas pelo Biotério do Biopráticas – UVV. Um grupo de 21 animais foi submetido à ovariectomia bilateral.

As ratas foram separadas, identificadas e acondicionadas em gaiolas. As gaiolas foram identificadas com dia da castração, número da gaiola e o extrato administrado, sendo mantidas em condições de iluminação, ambiente climatizado adequados, com água filtrada e ração Biobase Alimentação Animal (Biotec®, Basequímica produtos químicos LTDA).

As ratas foram divididas em quatro grupos: o grupo castrada (CAST); o grupo castrada com tratamento de extrato alcoólico de almeirão-roxo (CTAA); grupo castrada com tratamento de extrato alcoólico de barbatimão (CTAB); e o grupo controle (CONT), o qual não foi submetido à cirurgia de retirada de ovário. Todos os animais dos grupos tiveram livre acesso à água e ração durante o tratamento.

### **Procedimento de castração**

Após anestesia com tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália), com dose calculada de 50 mg/kg de animal, as ratas foram castradas por meio de uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para remoção dos ovários. Posteriormente, realizou-se a sutura da musculatura e da pele. O mesmo processo foi feito no lado oposto (DANTAS *et al*, 1999). Ao final do procedimento, os animais receberam 0,1 mL do antibiótico enrofloxacin 2,5% (Flotril®, Schering-Plough), por via

intramuscular e no local da sutura aplicou-se topicamente iodopovidona.

### Tratamento com os extratos

A partir do décimo quarto dia após o processo de castração, foi dado início aos tratamentos, administrando 0,2 mL dos extratos por via oral (gavagem) durante 14 dias consecutivos com a solução resultante do filtrado, no período matutino, exceto nos grupos CAST e CONT. Semanalmente todas as ratas foram pesadas. No vigésimo oitavo dia, foi realizado o esfregaço vaginal, e em seguida, os animais foram sacrificados por meio de doses elevadas de anestésico Tiopental sódico para a retirada do útero (histerectomia).

### Esfregaço vaginal

Após quatorze dias de iniciado o tratamento, foi realizada coleta esfoliativa vaginal das ratas, através de Swab vaginal

(Figura 1A), onde foi rotacionado no sentido horário (em todas as direções) e imediatamente rolado sobre uma lâmina de microscopia limpa com rotulação identificativa (Figura 1B). Após secagem do esfregaço por agitação, a lâmina foi imersa em metanol, por um minuto para fixação, sendo logo depois corada com Panótico Rápido LB (PORTO *et al*, 2007). Depois de seca a temperatura ambiente, a lâmina corada foi aquecida brandamente, com auxílio de uma lamparina a álcool, e imediatamente depositou-se uma gota de Bálsamo do Canadá Sintético (Nuclear), assentando, em seguida, a lamínula com leve pressão para o espalhamento do bálsamo. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, de forma coordenada em "zigue-zague", utilizando objetiva em aumento de 40 vezes, para a caracterização morfológica e tintorial das células de descamação do epitélio vaginal.



Figura 1. A. Coleta esfoliativa vaginal por meio de swab. B. Rolagem do material coletado sobre a lâmina.

### Procedimento de histerectomia

A histerectomia foi realizada através da laparotomia, onde todo o intestino foi rebatido delicadamente, expondo, assim, o útero bilobado, localizando deste modo, o cérvix (ou cérvix) uterino (esta região é mais clara e mais consistente que o restante do útero),

realizando o corte neste nível. Os úteros foram distendidos suavemente para remoção de toda gordura aderida na extensão dos dois lobos, dissecando-os desta maneira ainda no animal (Figura 2). Feito isto, os úteros foram retirados e colocados sobre um pedaço de papel de filtro, removendo todo o excesso de gordura e de

secreção em seu interior, e em seguida, submetidos à obtenção do peso úmido em balança. O peso úmido foi corrigido pelo peso

corporal para estimar a hipertrofia uterina (peso do útero/peso corporal(mg/g)).



**Figura 2.** Visualização do útero no animal.

### **Análise Estatística**

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) uma via, para análise estatística dos valores do peso corporal, peso do útero e relação peso corporal/peso do útero, seguida pelo cálculo das diferenças mínimas significativas entre as médias pelo teste *post-hoc* Fisher's. Para análise estatística e representação gráfica dos resultados foram empregados os programas GBStat (S.N. 96003126) e Slide Write Plus (S.N. C018529), respectivamente. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As plantas medicinais almeirão-roxo e barbatimão foram selecionadas devido a uma possível característica estrogênica e pela baixa quantidade de pesquisas publicadas a respeito de possíveis fitoestrógenos existentes.

A casca da árvore do *Stryphnodendron barbatiman* Martius contém taninos, flobafenos, glicídio solúvel (COSTA, 2002), mucilagens, materiais resinosos, amido, açúcares solúveis,

flavonóides (SAMPAIO, 2005) e não se reconheceu ainda a presença de alcalóides (COSTA, 2002). Já a folha da *Cichorium intybus* L. possui flavonóides, alcalóides, mucilagens, taninos e antocianina.

Existem dois tipos majoritários de receptores de estrogênio (RE) chamados de  $\alpha$  e  $\beta$ . No tecido epitelial mamário e uterino predominam os receptores RE $\alpha$ , enquanto no tecido ósseo e epitélio ovariano observa-se a expressão da isoforma RE $\beta$  (SILVA *et al*, 2009). Os flavonóides, um dos grupos pertencentes aos fitoestrogênios, estão presentes no almeirão-roxo e barbatimão, sendo transformados, no trato gastrointestinal, em fenóis heterocíclicos, cuja estrutura molecular tem semelhança bioquímica com 17 $\beta$ -estradiol (hormônio feminino), o que lhes permite se ligarem, fracamente, aos receptores estrogênicos, principalmente aos do tipo  $\beta$  (ALMEIDA, 2003).

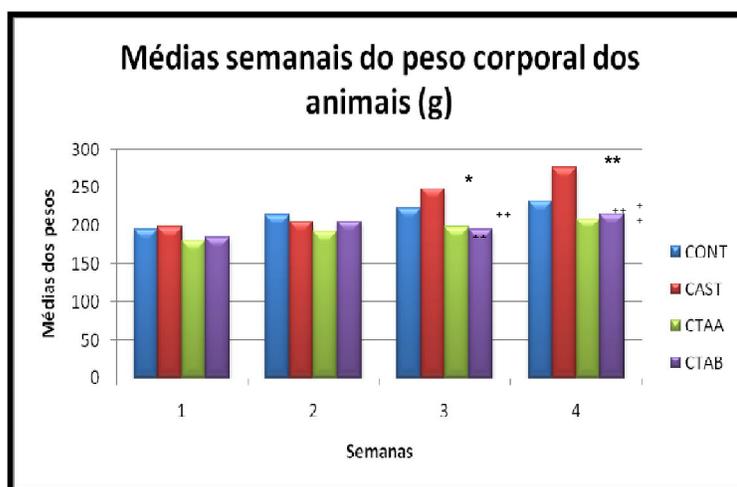
A partir desse princípio foram realizados os ensaio biológicos, cujos resultados podem ser visualizados no decorrer deste estudo.

Com os pesos corporais obtidos grupos e o erro padrão da média (Tabela 1 e semanalmente foram feitas as médias dos Figura 3).

**Tabela 1.** Médias semanais do peso corporal dos animais  $\pm$  EPM nas quatro semanas do experimento.

Grupos	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
CONT	194,4 $\pm$ 6,2	214,8 $\pm$ 8,9	223,2 $\pm$ 6,1	232,8 $\pm$ 8,7
CAST	197,3 $\pm$ 1,9	205,8 $\pm$ 5,0	249,0 $\pm$ 7,7*	275,5 $\pm$ 5,4**
CTAA	180,5 $\pm$ 12,0	192,3 $\pm$ 11,2	197,5 $\pm$ 8,3 <sup>++</sup>	208,5 $\pm$ 9,5 <sup>++</sup>
CTAB	185,0 $\pm$ 8,7	205,3 $\pm$ 4,8	195,3 $\pm$ 5,6 <sup>++</sup>	215,5 $\pm$ 13,0 <sup>++</sup>

\* p < 0,05 comparando ao grupo CONT. \*\* p < 0,01 comparada ao grupo CONT. + p < 0,05 comparando ao grupo CST. ++ p < 0,01 comparando ao grupo CST.



**Figura 3.** Médias semanais do peso corporal dos animais nas quatro semanas.

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, observa-se que até a segunda semana todos os grupos tiveram aumento de peso corporal semelhante, sendo inexistente a diferença estatística entre o grupo CONT e os demais grupos. No entanto, na terceira e quarta semana, período no qual ocorreu o tratamento, foi verificado aumento expressivo do massa corpórea do grupo CAST em relação ao CONT; esse mesmo aumento é observado quando comparado o grupo CAST aos CTAA e CTAB, mostrando que os animais tratados com os extratos apresentaram peso corporal próximo dos valores normais (CONT).

Segundo VASCONCELLOS, SABINO & PETROIANU (2005), a deficiência do estrogênio eleva o depósito adiposo visceral, com aumento da relação cintura/quadril, o que foi comprovado no grupo CAST, onde houve aumento de peso considerável. Além disso, o aumento de peso pode estar relacionado à redução do metabolismo basal, à redução da atividade física regular, ao aumento na ingestão de alimentos calóricos (ALANIZ, 2008).

A interação entre estrogênio e leptina também contribui para o ganho de peso (VASCONCELLOS, SABINO & PETROIANU, 2005). A leptina é uma substância sintetizada e secretada principalmente por adipócitos e, no

SNC, age primordialmente no hipotálamo, conhecido como a principal região do SNC que regula os estímulos de fome e saciedade (DONATO, PEDROSA & TIRAPEGUI, 2004).

Foi verificado em um estudo (DONATO, PEDROSA & TIRAPEGUI, 2004) com uma linhagem de camundongos que não secretavam adequadamente essa substância, era obesa e que a reposição hormonal provocava a redução do peso corporal, fazendo com que seu peso corporal retornasse a valores semelhantes ao de animais normais. Resultado observado nos

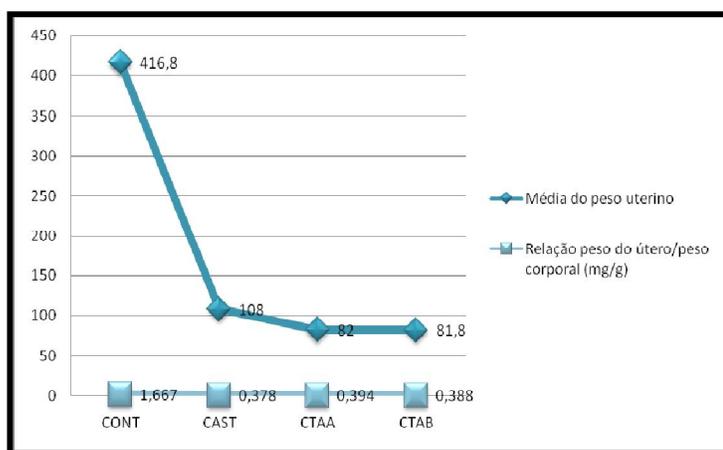
grupos CTAA e CTAB, que foram tratados com extratos. Nesses grupos, o ganho de peso foi reduzido, não ocorrendo uma grande variação, ou seja, os extratos das plantas poderiam ter normalizado os níveis de esteróides sexuais circulantes, e conseqüentemente, as concentrações de leptina.

Com os pesos uterinos obtidos ao final do experimento foram feitas as médias dos grupos, o erro padrão da média e, com os dados da Tabela 1, a relação do peso do útero/peso corporal(mg/g) (Tabela 2 e Figura 4).

**Tabela 2.** Média dos pesos dos úteros  $\pm$  EPM e relação do peso do útero com peso corporal  $\pm$  EPM

Grupos	Peso úmido do útero (média $\pm$ EPM)	Relação peso do útero/peso corporal (mg/g) (média $\pm$ EPM)
CONT	416,8 $\pm$ 62,8	1,667 $\pm$ 0,2
CAST	108,0 $\pm$ 7,7**	0,378 $\pm$ 0,02**
CTAA	82,0 $\pm$ 3,8**	0,394 $\pm$ 0,01**
CTAB	81,8 $\pm$ 3,2**	0,388 $\pm$ 0,036**

\*\* p < 0,01 comparada ao grupo CONT



**Figura 4.** Média dos pesos dos úteros e relação do peso do útero com peso corporal.

Conforme os dados da Tabela 2, observa-se que tanto no peso úmido do útero quanto na relação peso do útero/peso corporal, os grupos CAST, CTAA e CTAB determinaram uma redução significativa quando comparados ao

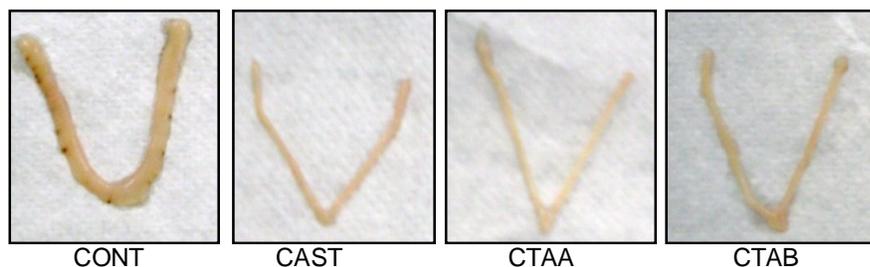
grupo CONT. Porém, não foi observado nenhuma alteração dos grupos CTAA e CTAB em relação ao CAST (Figura 5). Isto deixa bem claro que o tratamento com os extratos alcoólicos de almeirão-roxo e de barbatimão

não apresentaram ação uterotrófica sobre o endométrio dessas ratas, já que essas não mostraram diferença em relação as CAST, ou seja, os flavonóides presentes nesses vegetais não preveniram o efeito atrófico uterino nas ratas tratadas. Tal fato poderia derivar da não-responsividade dos flavonóides nos receptores estrogênicos, presentes no endométrio. O principal receptor estrogênico do útero é o subtipo  $\alpha$ , para o qual os flavonóides tem baixa afinidade. Estas observações podem explicar a ausência de efeito uterotrófico dos flavonóides nessas ratas, ou seja, os flavonóides apresentam ação seletiva, isto é, exibem atividade estrogênica em alguns tecidos e antiestrogênica em outros (TORREZAN *et al*, 2008). Porém é importante ressaltar, que ainda não há estudos que comprovem um efeito diferente se forem usadas doses maiores do que as usadas neste estudo.

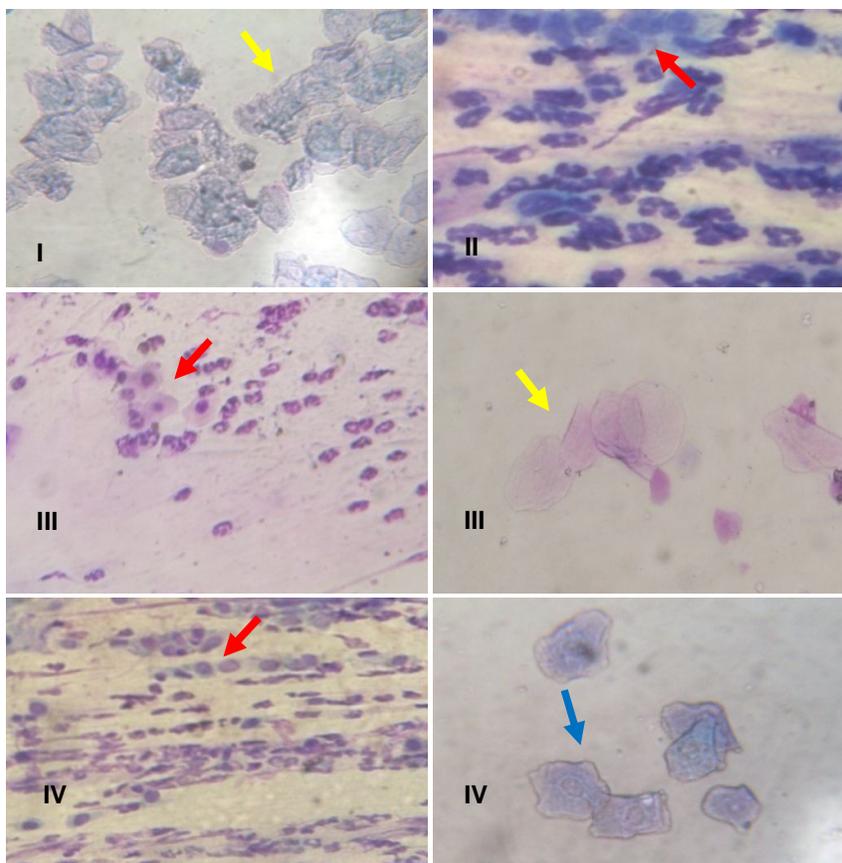
Após a análise do peso corporal e uterino e da relação entre ambos, foram feitas as leituras dos esfregaços (Figura 6).

Nos esfregaços da citologia esfoliativa foram analisados as características das células

oriundas do epitélio cérvico-vaginal, identificando-as como: basais, cuja morfologia é pequena, arredondada, com citoplasma compacto, basofílico e núcleo relativamente volumoso (ocupa 2/3 do conteúdo celular); parabasais, semelhantes às células basais entretanto apresentam núcleos menores (ocupa 1/2 ou menos da área celular), citoplasmas relativamente maiores e mais transparentes, com núcleo vesiculoso, no qual raramente se identifica um nucléolo; intermediárias, o citoplasma é denso e mais volumoso que o da célula basal, possuem formas geralmente naviculares, o núcleo é arredondado, apresenta cromatina finamente granular e predominam em esfregaços de mulheres na fase progestínica; e superficiais, o citoplasma é relativamente grande, poliédrico, com limites irregulares, mas bem definidos, o núcleo é picnótico e central, frequentemente, circundado por um halo claro e estreito, provocado pela sua retração, esse tipo celular é predominante em esfregaços de mulheres na fase estrogênica (GOMPEL, 1997).



**Figura 5.** Comparação do trofismo uterino nos diferentes grupos.



**Figura 6.** Esfregaço da citologia esfoliativa do epitélio vaginal das ratas dos grupos CONT (I), CAST (II), CTAA (III), CTAB (VI). Em III e IV houve invasão de neutrófilos, algumas células profundas e presença das células superficiais (III) e intermediárias (IV) comparada as CAST, que apresentaram variável quantidade de células profundas e infiltração por leucócitos. As setas amarelas indicam células superficiais; as vermelhas, células profundas; e a azul, células intermediárias

Essas células são identificadas nas fases do ciclo estral das ratas seguindo a classificação utilizada por JUNQUEIRA & MARTINS (1947) (Quadro 1) e MARCONDES, BIANCHI & TANNO (2002), que compreendem o proestro, estro, metaestro (I e II) e diestro.

O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro ou cinco dias. O estro, é o período em que a fêmea está receptiva ao macho e os períodos entre os estros, são denominados proestro, metaestro e diestro. A fase do proestro dura de 12 a 14 horas, ocorrendo a maturação de um ou mais folículos, com a

presença de células epiteliais no esfregaço; e precede a fase de estro (25 a 27 horas), único período em que a fêmea é receptiva ao macho e quando ocorre o coito; sendo identificada pela presença de células cornificadas no esfregaço. Se não há concepção, após o estro há um período de recuperação denominado metaestro, cuja duração é de 24 a 48 horas, seguido pelo diestro, que dura cerca de 24 horas, quando reinicia a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo; segue-se a esta fase um novo proestro (TESSARO *et al*, 2007).

FASES	MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL
Diestro	Baixa, constituída de poucas camadas celulares, não cornificada e infiltrada por leucócitos, na maioria neutrófilos.
Proestro	Aumento de números das camadas de células pavimentosas, início de degeneração da camada próxima ao lúmen vaginal. Início de cornificação das células que permitem individualizar dois planos e ausência quase total de leucócitos.
Estro	Desaparecimento da camada mais próxima ao lúmen vaginal, ficando o epitélio pavimentoso estratificado, cornificado e ausência de leucócitos.
Meta I	Descamação rápida, em massa, da camada córnea, enchendo o lúmen vaginal.
Meta II	Invasão por neutrófilos e continuação da descamação da camada córnea do epitélio.

**Quadro 1.** Células identificadas nas fases do ciclo estral de ratas (JUNQUEIRA & MARTINS, 1947).

No esfregaços do grupo CONT, as ratas apresentaram ciclo regular, com predominância da fase estro, caracterizada pelo desaparecimento da camada mais profunda e ausência de leucócitos, ficando predominantemente células superficiais queratinizadas ou não. As ratas dos grupos castradas comportam-se como se estivessem em fase diestro, possuindo esfregaço atrófico, caracterizado pela ausência de células superficiais, infiltrada por leucócitos, na maioria neutrófilos e porcentagem variável de células profundas, uma vez que, na ausência do ovário e, conseqüentemente, ausência do hormônio estrogênio as células não conseguem se diferenciar, não formando as camadas mais superficiais, demonstrando a regressão da mucosa. O índice de maturação sofre desvio à esquerda na pós-menopausa, com predomínio de células parabasais, situação que pode ser

que foram observados nos grupos CTAA e CTAB, nos quais verificaram-se a presença de células intermediárias e superficiais, com predomínio da fase metaestro, portanto houve uma considerável melhora no trofismo vaginal, indicando a ação estrogênica do *Stryphnodendron barbatiman* Martius e da *Cichorium intybus* L. em extrato alcoólico.

O epitélio da mucosa vaginal apresenta variações que refletem o ciclo funcional do folículo ovariano. Assim, a análise de células epiteliais descamadas pelo swab, permite verificar o estágio hormonal estabelecido pelo ovário. No climatério, observam-se esfregaços vaginais hipotróficos ou até acentuadamente atróficos. O esfregaço atrófico se caracteriza pela ausência de células superficiais eosinófilas e por porcentagem variável de células profundas. O grau de atrofia é tanto maior quanto maior a quantidade de células profundas

encontradas no esfregaço (LUSTOSA *et al*, 2002).

O estrogênio estimula o crescimento e a diferenciação das células do epitélio cérvico-vaginal. Embora o efeito estrogêneo dos fitoestrógenos seja muito fraco eles podem exercer efeito agonístico e/ou antagonístico sobre os  $\beta$ -estrogênios endógenos, por competirem pelos mesmos receptores. O efeito biológico dos fitoestrogênios varia de acordo com a fase biológica da mulher. Na pré-menopausa, quando a concentração de hormônios circulantes é alta, o resultado é a fraca ação estrogênica ou antiestrogênica. Na pós-menopausa, quando a concentração do estrogênio endógeno diminui, os receptores ficam mais disponíveis, favorecendo a ação estrogênica dos fitoestrogênios, que acabam compensando a deficiência do hormônio humano. Assim, além de poderem proporcionar melhora dos sintomas da menopausa, elas podem manter a ação estrogênica positiva no metabolismo ósseo, no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular (TORREZAN *et al*, 2008).

## CONCLUSÕES

Os ensaios biológicos com almeirão-roxo e barbatimão demonstraram ação estrogênica no epitélio cérvico-vaginal (presença das células intermediárias e superficiais) e na redução do peso corpóreo dos animais que foram tratados

com os extratos (CTAA e CTAB) em relação aos apenas castrados (CAST).

O peso uterino e a relação peso uterino/peso corporal (mg/g) apresentou diferença em relação às CONT, entretanto não houve alteração quando comparada às CAST, o que demonstra ausência da ação estrogênica no útero, já que as CTAA e CTAB deveriam ser distintas das CAST e semelhantes aos CONT. A utilização de doses maiores poderiam, talvez, apresentar um melhor resultado no trofismo vaginal e quiçá uterino.

Este projeto pode colaborar futuramente com novos estudos voltados para a utilização de extratos alcoólicos de almeirão-roxo e barbatimão como Terapia Alternativa (TA) no tratamento de mulheres menopausadas na tentativa de reduzir os efeitos adversos da TRH, sendo necessário ensaios mais apurados para uma melhor análise desses vegetais nos requisitos de toxicidade, efeitos colaterais e outras atividades não analisadas nesse trabalho, bem como um diagnóstico preciso para uma melhor verificação do efeito hormonal, já que segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 65 a 80% da população mundial que vive nos países em desenvolvimento dependem basicamente de plantas medicinais para o primeiros cuidados de saúde, devido a pobreza e da ausência de acesso a medicamentos industrializados (ARANTES *et al*, 2005).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaniz MS. Terapia de Reposição Hormonal: Hormônio Engorda? [on line]. Disponível: <http://www.physiosul.com.br/noticias-dicas-centro-fisioterapia-03.php?menu=noticias&id=3>. [capturado em 11 maio 2009].

Almeida AB. *Reavaliando o climatério*: Enfoque atual e multidisciplinar. São Paulo: Atheneu, 2003.

Arantes MCB, et al. Caracterização farmacognóstica de *Eclipta alba* (L.) Hassk, Asteraceae (agrião do brejo). *Ver. Elet. Farm.*, Suplemento, 2005, 2(2): 21-24.

Camargo MTLA. *Medicina popular*. São Paulo: Almed, 1985.

Costa AF. *Farmacognosia*. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002, 1.

Dantas AP, et al. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999, 34: 914-919.

Donato JJ, Pedrosa RG, Tirapegui J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. jul/set 2004, 40(3): 273-287.

Han KK, et al. Efeitos dos Fitoestrogênios sobre Alguns Parâmetros Clínicos e Laboratoriais no Climatério. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro. 2002, 24(8): 547-552.

Junqueira LCU, Martins EO. *Atlas de anatomia microscópica do rato*. Universidade de São Paulo: Rossolillo, 1947.

Koss LG, Gompel C. *Citologia ginecológica: e suas bases anatomoclínicas*. São Paulo: Manole, 1997.

Lustosa AB, et al. Citologia Hormonal do Trato Urinário Baixo e da Vagina de Mulheres na Pós-menopausa, antes e durante Estrogenioterapia Oral e Transdérmica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro. 2002, 24(9): 573-577.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. 2002; 62(4): 609-614.

Medeiros SF, Maitelli A, Nince APB. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro. Nov. 2007; 29(11) 593-601.

Nahás EAP., et al. Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatérios e o perfil lipídico na mulher em menopausa. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2003; 25(5) 337-343.

Pardini D. Terapia hormonal da menopausa. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo. Ago. 2007; 51(6): 938-942, ago.

Pedro AO, Pinto-Neto AM, Costa-Paiva LHS, Osis MJD, Hardy EE. Síndrome do climatério: inquérito populacional domiciliar em Campinas, SP. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo. Dez 2003; 37(6): 735-742.

Piovesan AC, et al. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. Abr. 2005; 27(4): 204-209.

Porto RRM, et al. Perfil citológico vaginal de ovelhas da rala Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. *Ciência Animal Brasileira*. Jul/set 2007, 8(3): 521-527.

Programas para análise estatística e representação gráfica dos resultados: GBStat (S.N.96003126) e Slide Write Plus (S.N. C018529).

Sampaio MM. *Avaliação histológica da epiderme de ratos quando submetidos à aplicação tópica de Barbatimão*. 2005 [on line]. Disponível: <http://www.belezain.com.br/trabcientificos/trabcientificos.asp> [capturado em 19 maio 2009].

Santos MA, Pereira FM. *Efeito das isoflavonas do leite de soja na concentração hormonal ovariana de ratos wistar fêmeas ovariectomizadas unilateralmente*. Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas da Faculdade Assis Gurgacz, Paraná. 2007. 15p.

Silva IV, et al. *Variações na expressão dos receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  em biópsias de mama e ovário de pacientes submetidas à terapia de reposição hormonal* [on line]. Disponível: <http://www.saudebrasilnet.com.br/premios/oncologia/premio2/trabalhos/cient008.pdf>. [capturado em 12 maio 2009].

Silva MM, et al. Depressão em mulheres climatéricas: análise de mulheres atendidas ambulatorialmente em um hospital universitário no Maranhão. *Revista Psiquiátrica do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre. Ago. 2008, 30(2): 150-154.

Tessaro L, et al. *Efeitos da canela (Cinnamomum verum) no ciclo estral de ratas (Listar)*. Monografia da Unioeste/Campus de Cáscavel, Extensão de Santa Helena, Paraná. 2007. 1p.

Torrezan R, et al. O tratamento com isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo. Dez. 2008; 52(9): 1489-1496 .

Tresvenzol LM, et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2006, 3(1): 23-28.

Vasconcellos LS, Sabino KR, Petroianu A. A relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Rio de Janeiro. Mai/jun 2005, 32(3): 132-135.