

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESTROGÊNICO DE *Morus* sp. EM RATAS WISTAR:

Estudo histológico e histomorfométrico*

*Evaluation of the estrogenic effect of **Morus sp.** in Wistar rats:
Histology and histomorfometric study*

Ingrid de Oliveira e Silva**

Ive Cerqueira dos Santos**

Vera Maria Peters***

Rogério Estevam de Faria***

Amaury Teixeira Leite Andrade***

SILVA, I. O.; SANTOS, I. C.; PETERS, V. M.; FARIA, R. E.; ANDRADE, A. T. L.: Avaliação do potencial estrogênico de *Morus* sp em ratas Wistar. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 22, p. 49-57, 2003.

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi verificar se a infusão de folhas de *Morus* sp possui efeito estrogênico, visto que existem informações de seu uso popular, por mulheres no climatério, para substituir a terapêutica da reposição hormonal convencional. Para isto, ratas Wistar adultas foram ooforectomizadas e, após 17 dias de recuperação, distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: Controle negativo (ooforectomizadas sem tratamento); Controle positivo ($10^{-3}\mu\text{g/g}$ de 17β -estradiol); Infuso (2,8 mL/Kg de infusão de folhas de amora) e Veículo (1mL de água destilada por via intragástrica). Todos os grupos, exceto o controle negativo, foram tratados por 20 dias consecutivos, período em que foi realizado, diariamente, o esfregaço vaginal para determinação da fase do ciclo. No 20º dia de tratamento, as ratas foram submetidas a excesso de inalação de éter para eutanásia. Útero e vagina foram removidos e fixados para análise histopatológica e histomorfométrica. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa na morfologia de útero e vagina, nem na proporção de fase estrogênica, com o uso do infuso de folhas de *Morus* sp.

Palavras-chave: *Morus* sp. Efeito estrogênico. Ratas.

* FINANCIAMENTO: Projeto FINEP CT Infra- I.

** Estagiária do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF.

*** Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF.

INTRODUÇÃO

A amoreira (*Morus* sp), oriunda do continente asiático e aclimatada no Brasil, é uma árvore de pouca altura e copa larga, cujas folhas são revestidas por tricomas, as inflorescências são do tipo cacho e as infrutescências são ovaladas, negras ou vermelhas brilhantes, quase sésseis, e comestíveis (CRUZ, 1988).

As folhas são empregadas externamente em gargarejos, para combater aftas e amigdalite, no combate a febre e a dor de dente (CRUZ, 1988; LAINETTI; BRITO, 1979; MOREIRA, 1979). Da infrutescência é feito xarope, utilizado em diarreias e como vermífugo, além de ser expectorante e adstringente (MORGAN, 1992). Em estudos recentes, foi descoberto que possui capacidade de regulação da hiperglicemia e retardo da catarata (ANDALLU et al., 2003). A decoção da casca da raiz tem efeito purgativo e vermífugo (MOREIRA, 1979).

Informações pessoais (Prof. Dr. Amaury T.L. Andrade) indicam que a infusão de *Morus* sp é utilizada por mulheres, durante o climatério, na substituição da terapêutica da reposição hormonal convencional, com efeito semelhante ao obtido com o uso de estrogênio.

Diante da ausência de informações na literatura consultada sobre o efeito de folhas de amoreira no sistema reprodutor feminino, neste trabalho verifica-se, em ratas Wistar ooforectomizadas, se a infusão das folhas de *Morus* sp possui efeito estrogênico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 32 ratas Wistar, originárias do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF, com idade entre 58 e 64 dias. As ratas foram submetidas a ooforectomia (6) sob anestesia com éter etílico. Durante dezessete dias, os animais submetidos à cirurgia ficaram alojados (cinco a cinco) em gaiolas de polipropileno, providas de cama de maravalha selecionada, ração peletizada e água “ad libitum”, dispostas em estantes climatizadas, de forma a se recuperarem da cirurgia e a reduzirem a níveis mínimos o estrogênio endógeno.

Posteriormente, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, cada um com oito animais, a saber:

Controle positivo: cada rata recebeu, via intramuscular, 17 μ -estradiol (10⁻³ μ g/g peso corporal) uma vez por dia, pela manhã, durante 20 dias consecutivos.

Infuso: recebeu, via intragástrica, 2,8 mL/Kg de peso corporal de infusão de folhas de amoreira (duas folhas médias para 250mL de água), durante 20 dias consecutivos. A dosagem foi baseada em informações obtidas de mulheres na menopausa, que fazem uso do chá como “terapia hormonal de reposição de estrogênio”.

Veículo: ao grupo de animais foi administrada água (2,8 mL/Kg de peso corporal), duas vezes ao dia, via intragástrica, durante 20 dias consecutivos.

Controle negativo: constou de animais ooforectomizados, sem qualquer tratamento.

No 21^o dia, 24h após o término do tratamento, todos os animais foram mortos por excesso de inalação de éter etílico. O sistema reprodutor foi removido, certificando-se da ausência de restos ovarianos em cada extremidade do corno uterino. Útero e vagina foram fixados em formol cálcio e processados para inclusão em parafina, corte de sete μ m e coloração em hematoxilina e eosina. Cortes de útero e vagina de cada grupo foram examinados sob microscopia óptica para análise histológica e histomorfométrica (programa de imagens AXIO VISION 3.1), seguindo o padrão usado para humanos.

As seguintes variáveis foram observadas:

- 1 Identificação de fases estrogênica (proestro e estro) e progesterônica (diestro).
- 2 Espessura do epitélio glandular do útero.
- 3 Espessura do epitélio vaginal.
- 4 Descrição dos aspectos histológicos observados no útero e na vagina.

A análise estatística foi realizada por teste Qui-quadrado, para análise da proporção de fases estrogênicas e análise de variância de uma via, seguida do teste de Bonferroni, para os dados contínuos.

O projeto do trabalho foi analisado pela comissão de ética em experimentação animal do Centro de Biologia da Reprodução, tendo sido aprovado (Certificado 007/2002).

RESULTADOS

Não foram observados restos de ovário ao exame macroscópico do sistema reprodutor, demonstrando o êxito da ooforectomia.

O Gráfico 1 mostra a distribuição de fases estrogênicas e progesterônicas, nos quatro grupos experimentais.

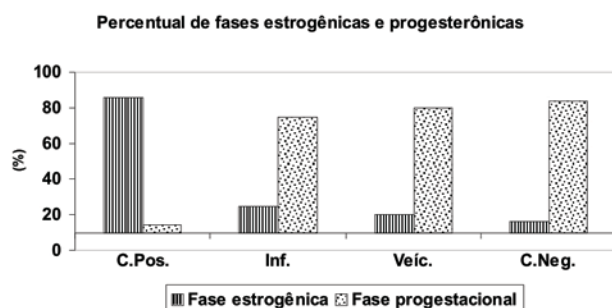


GRÁFICO 1: Percentual das fases estrogênica e progesteracional em ratas dos grupos controle positivo (**C.pos.**), infuso de folhas de amoreira (**Inf.**), veículo (**Veíc.**) e controle negativo (**C. neg.**). * $p < 0.01$.

Nota-se, no grupo controle positivo, a elevada proporção de fase estrogênica e baixa proporção de fase progesterônica ($p < 0.01$), em relação aos demais grupos. Não houve diferença significativa entre o grupo infuso, veículo e controle negativo.

Na Tabela 1, encontra-se a medida da espessura (μm) do epitélio glandular do útero e do epitélio da vagina.

TABELA 1: Espessura (μm) dos epitélios glandular do útero e escamoso da vagina de ratas controle positivo, infuso, veículo e controle negativo.

Grupos	Epitélio glandular do útero*	Epitélio escamoso da vagina*
C. Positivo	31,8 \pm 2,6 (8)**	112,6 \pm 11,2 (8)**
Infuso amora	12,3 \pm 1,0 (8)	30,0 \pm 6,5 (8)
Veículo	13,8 \pm 6,2 (8)	39,6 \pm 6,4 (8)
C. negativo	10,8 \pm 1,1 (8)	37,1 \pm 4,3 (8)

* Resultados expressos em média \pm desvio padrão (número de casos).

** $p < 0.01$ em relação aos demais grupos.

Observa-se que a espessura dos epitélios foi semelhante entre os grupos controle negativo, infuso e veículo. Os três grupos têm espessura menor que o grupo tratado com estrogênio (controle positivo).

Análise Histológica e Histomorfológica:

- ✓ **Grupo C Positivo:** epitélio vaginal escamoso alto, com várias camadas celulares e ceratinizadas superficiais. O epitélio glandular uterino encontra-se pseudo-estratificado, com células exibindo núcleos vesiculosos e nucléolo evidente.
- ✓ **Grupos: Infuso, Veículo e C. Negativo:** Os cortes histológicos exibem epitélio escamoso vaginal com menor número de camadas celulares. Observa-se epitélio glandular uterino, revestido por células cúbicas ou cilíndricas, com núcleos regulares.

A Figura 1, adiante, mostra cortes histológicos de epitélio vaginal dos grupos estudados.

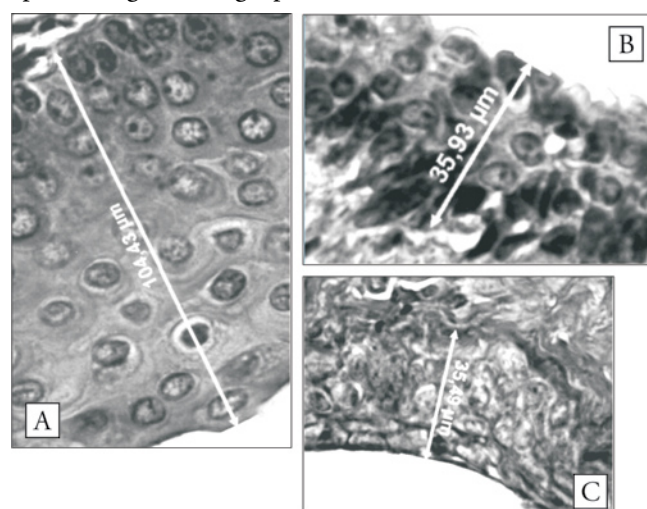


FIGURA 1: Corte histológico de epitélio vaginal de ratas ooforectomizadas que receberam estrogênio (A), infuso de folhas de amoreira (B) e veículo (C). (H.E. 400X). Observa-se epitélio escamoso vaginal alto, no grupo que recebeu estrogênio, em contraste com o epitélio vaginal baixo dos outros grupos.

DISCUSSÃO

Útero e vagina são órgãos-alvo para os hormônios ovarianos. Sob efeito estrogênico, o epitélio superficial

do útero e o epitélio glandular, assim como o epitélio pavimentoso da vagina exibem multiplicação celular, evidenciada por mitoses, e aumento de sua espessura (7, 8). Como pode ser observado no presente trabalho, 17 dias após ooforectomia, houve atrofia do útero e da vagina, demonstrada pela redução da altura do epitélio de ambos os órgãos. Quando um grupo de animais foi tratado com estrogênio (Controle positivo), nota-se a resposta efetiva, resultando na elevada proporção de fases estrogênicas e no aumento significativo da espessura do epitélio glandular uterino e da espessura do epitélio vaginal (Figura 1).

A administração do infuso de folhas de amoreira, entretanto, não aumentou a proporção de fase estrogênica nem a espessura dos epitélios, quando comparados ao controle negativo (ooforectomizadas sem tratamento) e ao veículo (Figura 1), evidenciando, dessa forma, ausência de indícios de efeito estrogênico.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, no modelo experimental e na dose utilizada, a infusão de folhas de amora (*Morus* sp) não apresentou efeito estrogênico.

SILVA, I. O.; SANTOS, I. C.; PETERS, V. M.; FARIA, R. E.; ANDRADE, A. T. L.; Evaluation of the estrogenic effect of *Morus* sp. in Wistar rats: Histology and histomorfometric study. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 22, p. 49-57, 2003.

Abstract: The purpose of the present work was to verify whether the infusion of *Morus* sp leaves presented estrogenic effect as information based on its popular use by menopause women suggested that this infusion could replace the conventional hormonal reposition. To carry out this work, adult female Wistar rats underwent oophorectomy and after a 17-day recovery they were randomly distributed into four groups: negative control (oophorectomy without treatment); positive control ($10^{-3}\mu\text{g/g}$ of 17β estradiol); infusion (2,8 ml/kg of *Morus* sp leaves infusion) and vehicle (1ml of distilled water orally). Except for the negative control group, all groups were treated for 20 days. During this period, daily vaginal smear was performed to determine the phase of the cycle of the females. On the 20th day of treatment the animals were killed by an overdose of ether inhalation. Uterus and vagina were dissected out and fixed for histopathological and histomorphometric analyses. Statistical analysis was carried out using the Chi square test for the analy-

sis of the proportion of the estrogenic phases and Anova One-way followed by the Bonferroni test was used for continuous data. The results showed that the use of the infusion of *Morus* sp leaves caused no significant difference in the uterus and vagina morphology and in the proportion of the estrogenic phase.

Key words: *Morus* sp. Estrogenic effect. Female rats.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do Centro de Biologia da Reprodução, Rosimar Rodrigues de Azevedo, Paulo Sérgio Carmo e Evelise Rocha Sousa; aos estagiários, Aldo César Passilongo da Silva, pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1988.

LAINETTI, R.; BRITO, N. R. S. **A cura pelas ervas e plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1979.

MOREIRA, F. **As plantas que curam**. São Paulo: Hemus, 1979.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. São Paulo: Hemus, 1992.

ANDALLU, B. et al. Control of hyperglycemia and retardation of cataract by mulberry (*Morus indica* L.) leaves in streptozotocin diabet rats. **Medline**, v. 21, n. 7, p. 669-675, 2003.

SHIH, C. C. et al. Ameliorative effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteopenia in ovariectomized rats. **Journal of Ethnopharmacology**, London, v. 77, p. 231-3, 2001.

STRAUSS III, J.; COUTIFARIS, C. The endometrium and myometrium: regulation and dysfunction. In: YEN, S. S. C.; JAFFE, R. B.; BARBIERI, R. L. **Reproductive endocrinology**. 4th ed. London: W. B. Saunders, 1999. cap. 8, p. 218-283.

PAGE, E. N.; VILLEE, C. A.; VILLEE, D. B. Common Gynecology Disorder Other Than Neoplastic. In: _____. **Human reproduction:** essentials and perinatal medicine. 3rd ed. London: W. B. Saunders, 1981. p. 435-436.

