

**DECIO LUÍS ALVES**

**AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA VAGINAL E ESTUDO MORFOLÓGICO E  
IMUNOISTOQUÍMICO DOS EFEITOS *DO TRIFOLIUM PRATENSE* E DA  
*CIMICÍFUGA RACEMOSA* NO ENDOMÉTRIO DE *RATTUS NORVEGICUS*  
*ALBINUS* OOFORECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa  
Casa de São Paulo, para obtenção do título de  
Mestre em Medicina

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**DECIO LUÍS ALVES**

**AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA VAGINAL E ESTUDO MORFOLÓGICO E  
IMUNOISTOQUÍMICO DOS EFEITOS *DO TRIFOLIUM PRATENSE E DA  
CIMICÍFUGA RACEMOSA* NO ENDOMÉTRIO DE *RATTUS NORVEGICUS  
ALBINUS* OOFORECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São  
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Medicina

**Área de concentração: Tocoginecologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Rolim Rosa Lima**

**Co-orientador: Prof. Dr. Alberto Schanaider**

SÃO PAULO

2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Alves, Decio Luís

Avaliação da citologia vaginal e estudo morfológico e imunoistoquímico dos efeitos do *trifolium pratense* e da *cimicífuga racemosa* no endométrio de *rattus norvegicus albinus* ooforectomizadas./ Decio Luís Alves. São Paulo, 2008.

Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-graduação em Medicina.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Sonia Maria Rolim Rosa Lima

Co-Orientador: Alberto Schanaider

1. Endométrio
2. Receptores estrogênicos
3. Antígeno Ki-67
4. Cimicífuga
5. Trifolium
6. Morfologia
7. Imunoistoquímica

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais LUIZ e DILEMA, presentes a cada passo de meu caminho com amor, suporte e conselhos

A RITA DE CASSIA, esposa, amiga e companheira de tantos anos, pelo amor, dedicação e paciência nos momentos difíceis

A minhas filhas THAIS e ISIS, pelo carinho na minha presença e saudades na minha ausência

Aos meus irmãos CARLOS e DEISE, bem como seus respectivos cônjuges ROSÂNGELA e JORGE, pela fé e torcida constante nestes anos

A mestra Prof. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Rolim Rosa Lima por acreditar comigo que o sonho distante poderia se tornar real

**AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Alberto Schanaider e à toda a equipe da Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro por me guiarem na parte experimental.

À Prof. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão por sua gentileza em nos orientar e fornecer os subsídios para a confecção e leitura das lâminas histológicas, bem como aos técnicos da Anatomia Patológica do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Ao Prof. Dr. José Carlos de Jesus Conceição, Prof. Dr. Renato Ferrari, Prof. Dr. Carlos Augusto Faria e todo o staff do Serviço de Ginecologia do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas orientações e suporte durante estes anos.

Aos professores da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo pela recepção ao aluno e pela formação do professor.

A Prof. Rita de Cássia Barros e Prof. Elizabeth Pereira dos Santos da Farmácia Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na confecção dos preparados farmacológicos para a tese.

A Priscile Foster e todo o pessoal administrativo da Pos-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa da Misericórdia de São Paulo, por me orientarem e ajudarem nesta missão.

Ao pessoal da Biologia Molecular do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela confecção das peças para patologia.

Ao staff do Departamento de Estatística do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho pelo suporte a este trabalho.

À amiga Dra. Célia Regina da Silva, por estar comigo nesta empreitada e pelo apoio em todos os momentos do trabalho.

Aos amigos Leila, Maria de Fátima, Israel, Andrea Paula e Arnaldo, por compreenderem minhas ausências nas cirurgias e me apoiarem até o final.

A minha secretária Patrícia por dar todo o suporte no consultório durante estes anos.

Aos pacientes do Hospital Universitário da UFRJ e do consultório pela inspiração e pela paciência durante minhas ausências.

A todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma e contribuíram para este momento de minha vida, meus mais profundos agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Caracterização das espécies vegetais .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 <i>Cimicifuga racemosa</i> e endométrio .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 <i>Trifolium pratense</i> e endométrio .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Receptores de hormônios esteróides .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Proteína Ki67 .....</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Características do material em estudo .....</b>	<b>11</b>
<b>1.7 Método imunistoquímico .....</b>	<b>12</b>
<b>1.8 Método morfométrico .....</b>	<b>13</b>
<b>1.9 Citologia vaginal .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Animais de experimentação .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Seqüência experimental .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.1 Ooforectomia .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2 Suplementação hormonal .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3 Citologia vaginal .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4 Preparação dos tecidos .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Método histopatológico .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Método imunistoquímico .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5 Método morfométrico .....</b>	<b>29</b>

3.6	Método estatístico .....	29
4	RESULTADOS .....	31
4.1	Peso inicial e final dos animais em estudo .....	32
4.2	Citologia vaginal .....	36
4.3	Histologia .....	40
4.4	Receptores de Estrogênio e Proteína Ki67 em endométrio .....	41
5	DISCUSSÃO .....	46
6	CONCLUSÃO .....	62
7	ANEXOS .....	65
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
9	RESUMO .....	91
10	SUMMARY .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	<b>aminoácidos</b>
<b>AR</b>	<b><i>Actea racemosa</i></b>
<b>CR</b>	<b><i>Cimicifuga racemosa</i></b>
<b>RE <math>\alpha</math></b>	<b>Receptor estrogênico alfa</b>
<b>RE<math>\beta</math></b>	<b>Receptor estrogênico beta</b>
<b>SERM</b>	<b>Modulador seletivo de receptor estrogênico</b>
<b>TP</b>	<b><i>Trifolium pratense</i></b>

## **1.INTRODUÇÃO**

Na última década, a utilização de medicamentos padronizados de origem vegetal para tratar diversas doenças ganhou nova dimensão. Tais compostos apresentam substâncias marcadoras em uma concentração e dosagem constantes, o que lhes confere a capacidade de análise experimental sob parâmetros reproduzíveis e de alta precisão. Estas características e a generalização de seu uso levaram vários países, dentre os quais o Brasil, a determinar uma legislação específica para esta nova classe de medicamentos (Wollschlaeger, 2003; Cohen, 2003; Brandão, 2006).

Dentre as diversas afecções para as quais se propõe a terapia com estes fitoterápicos, sobressaem as queixas decorrentes das alterações hormonais, particularmente no climatério. Existe, atualmente, um grande interesse em alternativas medicamentosas para controlar tais sintomas.

Entretanto, o uso dos derivados de plantas ainda está envolto em grande controvérsia, não sendo reconhecido por grande parte da comunidade científica (Oerter Klein *et al.*, 2003; Taylor, 2003). A última revisão sobre o assunto, efetuada pela Sociedade Norte Americana de Menopausa, atesta não existirem evidências suficientes para negar ou confirmar a eficácia de fitoterápicos nas manifestações do climatério (The North American Menopause Society, 2004), por outro lado trabalhos recentes demonstram que podemos utilizar eficientemente os fitoestrogênios em mulheres no início da menopausa e que apresentem sintomas leves ou moderados; respeitados estes parâmetros, devem ser avaliados como uma possibilidade terapêutica de primeira linha (Tempfer *et al.*, 2007).

Entre as espécies de plantas mais estudadas, destacam-se a *Cimicifuga racemosa* (CM), o *Trifolium pratense* (TP) e as isoflavonas de soja. A CM e o TP motivaram diversos trabalhos clínicos randomizados na última década, demonstrando ação no tratamento dos sintomas do climatério (Hidalgo et al, 2005; Alves, 2006 Radowicki et al., 2006; Wuttke et al., 2006; Uebelhack et al. 2006; Imhoff et al. 2006).

### **1 .1. CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS**

A *Cimicifuga racemosa* (CR), *Acteia racemosa* (AR) ou Cimicífuga é nativa da América do Norte tendo se aclimatado bem na Europa. Os índios pré-colombianos já conheciam suas propriedades terapêuticas; essas tribos utilizavam as raízes e folhas desta planta em preparações para diminuir a dor do trabalho de parto ou como antídoto para picada de cobra. (Mahady, 2005) Desde o século XIX, são enfatizadas suas propriedades antiinflamatórias e anti-hipertensivas, com relatos de uso para dor pélvica, cólicas menstruais, cefaléia e dores articulares. A farmacopéia britânica também cita outras indicações tais como artrite, reumatismo, mialgia, dor ciática e tosse. (Mahady, 2002) A partir de 1995, vários estudos demonstraram sua atividade na redução dos sintomas do climatério (Lehmann-Willenbrock *et al.*, 1988; Mckenna *et al*, 2001; Liske *et al*, 2002; Winterhoff *et al*, 2002; Low Dog *et al*, 2003). Seus principais constituintes são glicosídeos triterpênicos, alcalóides, isoflavonas (formononetina) e derivados fenilpropanoicos. As doses recomendadas para humanos variam entre 2 a 4 mg de deoxiacteína (substância marcadora dos derivados de CR) por dia (Kaari, Baracat, 2006).

O *Trifolium pratense* (também conhecido como Trevo Vermelho) ou Trifolium é, de longa data, estudado pela Medicina Chinesa Tradicional; sendo empregado como nutriente e agente terapêutico para diversas afecções. Seu uso disseminou-se pela Ásia Central e Europa, estando incorporado a diversas Farmacopéias em face do conhecimento de suas propriedades terapêuticas. Está indicado tradicionalmente para doenças pulmonares e da pele e distúrbios hormonais. A atividade esteroidal do Trevo Vermelho foi primeiramente verificada em vacas e ovelhas que, ao se alimentarem desta planta em grandes quantidades, desenvolviam infertilidade (Doença do Trevo); entretanto, tal fato não foi observado em humanos, mesmo com ingestão de altas doses de seus derivados. Seus principais constituintes são as isoflavonas, os derivados cumarínicos, glicosídeos cianogênicos e óleos voláteis. As doses usuais variam de 20 a 80 mg de isoflavonas de TP por dia. (Lima, Alves, 2006)

Ambas as plantas possuem extratos padronizados e registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratamento dos sintomas do climatério, tais como: fogachos, insônia, ondas de calor e labilidade emocional. Entretanto, até o momento, as informações quanto à dose mais eficiente em relação às características da mulher e ao produto utilizado são incompletas, bem como a resposta de certos órgãos e tecidos ao seu estímulo hormonal (Mahady, 2005).

## **1.2. CIMICIFUGA RACEMOSA E ENDOMÉTRIO**

Poucos trabalhos relacionam a atividade endometrial e as ações da *Cimicífuga racemosa*.

Wuttke *et al* (2003), em estudo duplo-cego randomizado com 62 mulheres após a menopausa com idades variando entre 40 e 60 anos, que receberam extrato de Cimicífuga (n = 20), estrogênios conjugados (n = 22) e placebo (n = 20) por 12 semanas, observaram que a espessura endometrial permaneceu inalterada, de forma semelhante ao placebo, mas sofreu aumento significativo com o uso de estrogênios conjugados. Os autores concluem que extratos de CR não apresentam estímulo endometrial significativo e, conseqüentemente, não devem induzir neoplasia endometrial, o que poderia autorizar o seu uso sem o acréscimo de progestógenos para proteção do endométrio.

Jarry *et al* (2003), em estudo imunoistoquímico em células endometriais humanas e de porcas, observaram atividade endometrial não relacionada a receptores estrogênicos alfa ou beta, especulando sobre a existência de um possível receptor estrogênico gama, já observado em certas espécies de peixe.

Kretzschmar *et al* (2005), em estudos com ratas ooforectomizadas verificaram que, comparativamente ao estradiol, não ocorreu estimulação uterina após 17 dias de suplementação, avaliando o peso uterino, a expressão de receptores estrogênicos e a proteína Ki67.

### **1.3. TRIFOLIUM PRATENSE E ENDOMÉTRIO**

Também são descritos poucos estudos do TP e sua ação endometrial. Nestes, não se verifica estímulo proliferativo ou hiperplásico. (Clifton-Bligh *et al*, 2001; Hale *et al*, 2001; Imhof *et al*, 2006).

Clifton-Bligh *et al* (2001) realizaram estudo duplo-cego e randomizado com 46 mulheres com um ano ou mais de menopausa e com idade até 65 anos; foram administrados placebo ou extratos de *Trifolium pratense* em três doses diferentes (28,5 mg, 57 mg e 85,5 mg por dia, respectivamente) pelo período de 6 meses. Verificaram que a espessura endometrial, avaliada pela ultrassonografia transvaginal, não apresentou mudança estatisticamente significativa ao final do período e nenhuma delas apresentou endométrio maior que 5 mm.

Hale *et al.* (2001) efetuaram estudo duplo-cego e randomizado em 30 mulheres na perimenopausa, com idades entre 45 e 53 anos que autorizaram biopsia endometrial antes e após a utilização de extratos de TP na dose de 50 mg ou placebo por três meses. Não encontraram diferença na intensidade de expressão da proteína Ki-67, caracterizando ausência de proliferação ou inibição de proliferação celular no endométrio.

Imhof *et al* (2006), em estudo duplo-cego randomizado com 109 mulheres após a menopausa que receberam 80 mg de extratos de TP durante 90 dias, observaram diminuição da espessura endometrial avaliada pela ultrassonografia transvaginal em relação ao placebo, sem alterar as concentrações séricas de estradiol. Concluem que as substâncias presentes nestes derivados devem exercer algum efeito inibidor seletivo para as células endometriais, o que fornece evidência para futuros estudos das isoflavonas no tratamento dos sintomas do climatério e sua segurança em mulheres não histerectomizadas.

Não encontramos, até a presente data, trabalhos que analisassem os efeitos de TP no endométrio de ratas.

#### **1.4. RECEPTORES DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES**

Os hormônios esteróides estrogênios e progesterona são lipofílicos de pequeno peso molecular e estão envolvidos na regulação da função reprodutora exercendo também ação em outros sistemas (Clark, McGuire, 1988). Demonstrou-se que os estrógenos e a progesterona apresentam mecanismo de ação similar em relação a seus receptores.

Os hormônios apresentam ação seletiva na dependência dos receptores celulares que pode ser explicada pela possibilidade da ativação de diferentes isoformas de receptores (derivados do mesmo gênero) ou subtipos (derivados de gêneros similares) (Clark, McGuire, 1988).

O receptor estrogênico (RE) é um fator nuclear responsável pelos efeitos biológicos do estrogênio. Pertence a uma família de receptores nucleares que inclui os receptores esteróides, os receptores retinóicos e outros ainda não identificados. São conhecidos três tipos de receptores estrogênicos:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (também conhecido como  $\beta_2$ ), sendo que as duas primeiras formas são as mais conhecidas e estudadas. O receptor estrogênico alfa (RE $\alpha$ ) é formado por 595 aminoácidos e possui grande similaridade com os receptores de outros hormônios esteróides. O receptor estrogênico beta (RE $\beta$ ) possui 485 aminoácidos e tem uma estrutura bastante semelhante ao anterior. Ambos os receptores estão distribuídos pelos

diversos órgãos e tecidos em quantidades variáveis. Atualmente tem sido descritos receptores estrogênicos híbridos, que apresentam semelhanças aos anteriores. (Kuiper *et al*, 1996; Li *et al*, 2004).

O receptor de estrogênio é dividido em seis regiões e cinco domínios de A a F. O RE $\beta$  tem 96% de homologia na seqüência de aa se comparado ao  $\alpha$  no domínio de ligação com o DNA, 53% de homologia no domínio de ligação hormonal (Weihua *et al*, 2003). As características das ligações hormonais do RE $\alpha$  e do RE $\beta$  são semelhantes, indicando que eles respondem de modo comparável aos mesmos hormônios (Kuiper *et al*, 1996).

O receptor de estrogênio  $\alpha$  é traduzido por um RNAm, derivado de um gene do braço longo do cromossoma 6 (Parker, 1993), com peso molecular de 66,000 daltons com 595 aminoácidos (aa) e meia vida de aproximadamente quatro a sete dias, portanto, uma proteína de alta renovação. O receptor de estrogênio  $\beta$  é codificado por um gene localizado no cromossoma 14 (Cramer *et al*, 2003).

Os avanços em Biologia Molecular alcançados nos últimos anos para elucidar o mecanismo de ação dos receptores estrogênicos permitiram descobrir os inibidores deste receptor que não se unem ao domínio de ligação hormonal. As diferentes formas adotadas pelo receptor estrogênico em presença de diferentes estruturas esteroidais influem diretamente na atividade transcricional, regulando a união de cofatores a esta parte da molécula e, indiretamente, modulando a estabilidade do receptor. Foram identificados vários peptídeos que atuam sobre a interação receptor-cofator, capazes de inibir a transcrição. A atividade biológica destas estruturas é, por vezes, intrigante. O efeito final encontrado será determinado

por: estrutura do subtipo de sitio de ligação estrogênica, a natureza da unidade ativadora e o balanço dos coativadores e correpressores presentes nas diferentes células alvo (Turgeon *et al* , 2004).

### **1.5. PROTEÍNA Ki67**

O antígeno nuclear Ki67 é encontrado em todas as células durante as fases G1, S, M e G2 do ciclo celular, mas está ausente na fase G0; desta forma, ele é um marcador da proliferação celular. É uma molécula que pode ser facilmente detectada nas células em fase proliferativa, dando uma idéia da intensidade e do ritmo de multiplicação celular (Sawhney, 1992).

Em 1983, Gerdes *et al.*, em estudo para a produção de anticorpos monoclonais que identificariam antígenos nucleares específicos das células de Hodgkin e Reed-Sternberg, descreveram a preparação de um anticorpo monoclonal de camundongo. Este foi denominado Ki67 por ser a amostra número 67 de um total de 167 anticorpos testados.

Em 1989, Schonk *et al.*, relataram que a proteína Ki67 é codificada por um único gene, localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25). Em revisão de literatura médica, Brown, Gatter (1990) verificaram que este marcador é encontrado em tecidos normais e neoplásicos de humanos e de alguns animais como o carneiro, cão, rato, coelho e bovinos.

Atualmente, tem sido proposta sua utilização como orientador no prognóstico de certos tipos de neoplasia endometrial e pulmonar (Zasławski et al, 2001; Carvalho et al., 2005; Oshima et al., 2005; Saber, Salehian, 2005). Poucos trabalhos têm o endométrio como foco da expressão desta proteína.

Cho et al (2004) observam que a expressão de Ki67 é variável durante o período menstrual, sendo muito alta na fase proliferativa e em menor intensidade na fase secretora; observam, ainda, que está ausente no período após a menopausa.

Özuyasal et al. (2005), estudando endométrio normal, hiperplásico e neoplásico em humanos, observam que a expressão desta proteína é diretamente relacionada a maior intensidade da proliferação celular.

Carvalho (2006), estudando o endométrio de 30 mulheres após a menopausa que apresentavam pólipos endometriais, observou que a expressão da proteína Ki67 foi significativamente maior no tecido glandular e no estroma do pólipos comparado ao endométrio adjacente.

Klaassens et al, (2006) estudaram o endométrio de mulheres após a menopausa que receberam terapia hormonal (estrogênio, tibolona, estrogênio + medroxiprogesterona) e observaram que a expressão de Ki67 foi significativamente maior naquelas que receberam reposição de estrogênio puro em comparação com os outros medicamentos.

Não existem estudos que demonstrem a expressão da proteína Ki67 no endométrio de ratas *Wistar*, porém este marcador foi utilizado com sucesso em estudos realizados com ratas *Berko* (Weihua *et al*, 2000).

## 1.6. CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL EM ESTUDO

A linhagem de ratos *Wistar* foi criada no Instituto *Wistar* de Anatomia e Biologia na Filadélfia (EUA) como a primeira espécie animal padronizada com uma homogeneidade genética para pesquisa em laboratório. A seleção genética destes ratos albinos começou em 1909, persistindo até os anos 1960 quando o Instituto vendeu os direitos de marca para utilização do nome Ratos *Wistar* (Clause, 1998).

Comparados ao organismo humano, o metabolismo do rato *Wistar* é muito acelerado; alguns estudos comparam o animal com 24 meses de vida ao humano de aproximadamente 60 anos de idade; sob esta ótica, cada dia de vida do animal corresponderia a aproximadamente 25 dias de vida do ser humano (Sakai *et al*, 1997; Kang *et al*, 2006).

Há décadas, estes animais são utilizados para estudo de substâncias farmacológicas pois oferecem um excelente meio de experimentação devido a sua homogeneidade genética, à facilidade de criação em biotérios, ao seu tamanho para manipulação cirúrgica e similaridade de reações histológicas se comparados ao organismo humano (Clause, 1998).

## 1.7. MÉTODO IMUNOISTOQUÍMICO

Os métodos bioquímicos vêm sendo progressivamente substituídos pelas técnicas imunoistoquímicas. Estas técnicas permitem observar o sítio específico do receptor nas células, distinguir atividade de receptor de estrogênio e receptor de progesterona.

A Imunoistoquímica surgiu com as pesquisas em imunopatologia que começaram na década de 1940, mas somente a partir da década de 1970 ganhou um sentido prático com utilização em maior escala, entrando para a rotina diagnóstica. Com a criação dos anticorpos monoclonais, que proporcionam reagentes de alta especificidade, a técnica teve grande desenvolvimento e aumentou sua participação em pesquisas científicas, no uso para diagnóstico e como prognóstico na evolução do paciente (Kupper, 1983)

As técnicas de coloração imunoistoquímica permitem que se faça a visualização de antígenos por meio da aplicação seqüencial de um anticorpo específico do antígeno (anticorpo primário), de um anticorpo secundário ao anticorpo primário, e de um complexo enzimático com um substrato cromogênico, com etapas de lavagem de permeio. A ativação enzimática do complexo resulta num produto de reação visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta com uma lamínula. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio de luz, e ajudam a formular o diagnóstico diferencial dos processos fisiopatológicos, os quais podem ou não estar associados a antígenos específicos (Schmitt *et al*, 1992; Schmitt *et al*, 1995).

Embora seja um método simples, os resultados podem ser influenciados por diversos fatores: fixação do espécime, escolha dos anticorpos, as diversas reações bioquímicas envolvidas, interpretação das lâminas (Werner *et al*, 2005).

## **1.8. MÉTODO MORFOMÉTRICO**

A quantificação, nas Ciências Biomédicas, objetiva verificar com precisão as medidas para obter uma análise diagnóstica correta e, se possível, também um prognóstico das condições encontradas a partir da devida análise dos dados (.Mandarim-de-Lacerda, 1991).

A palavra morfometria é formada pelo radical grego - *morphe*, que significa a forma, associado ao radical grego - *metrikos*, ou do latim - *metricu*, que significa ato de medir ou processo de estabelecer dimensões. Assim sendo, a Morfometria tem como meta tornar mais precisa a coleta, a apresentação e a análise dos resultados obtidos em pesquisas e na rotina de laboratório, permitindo ainda se relacionar as diferentes estruturas anatômicas com as funções em evidência (Montes *et al*, 1989). A análise pode ser macro e microscópica e, para nosso trabalho, analisaremos dados de microscopia.

A Ocular Integradora é um recurso freqüentemente utilizado na morfometria microscópica. Ela pode ser constituída por pontos, linhas ou outros elementos de identificação. O princípio de utilização é a identificação da coincidência (sobreposição) dos pontos ou linhas da ocular com determinada estrutura, objeto do estudo, por exemplo, determinadas células, vasos, colágeno e outros tecidos. Pode

ser substituída por uma matriz de pontos colocada na tela de um monitor ligado a uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio. O seu uso ainda é atual, pois não há forma de substituição pela morfometria computadorizada (Abdalla *et al*, 2005).

Outros recursos deste grupo seriam a câmara-clara que pode ser acoplada ao microscópio de luz ou uma lupa (microscópio estereoscópico), esse conjunto permite o desenho do campo observado ao microscópio/lupa em uma folha de papel ou uma mesa digitalizadora. A ocular de tambor é utilizada para avaliar diâmetros de estruturas, enquanto que a ocular quadriculada é utilizada para avaliar áreas. Embora esses recursos ainda sejam empregados, eles foram muito usados até o aperfeiçoamento da morfometria computadorizada (Abdalla *et al*, 2005).

A morfometria computadorizada pode ser de dois tipos:

- Interativa – a primeira a ser utilizada e que exigia a participação do pesquisador, que teria que contornar as estruturas a serem medidas para as comparações e mensuração dos dados. Como exemplo desse tipo de aparelho temos o MOP-videoplan e o KS100, ambos da Kontron-Zeiss.
- Automática – descrita ao final da década de 80, permite a medição automática, mais rápida e com menor interação do pesquisador, inclusive com a utilização de "Macros", que são gravações da rotina do procedimento morfométrico, acelerando ainda mais a coleta de dados. Os mais difundidos no nosso meio são os da série KS300 ou superior, da Kontron-Zeiss, e os da série Q500MC, da Leica.

Quanto ao cálculo do tamanho da amostra já existem formas de avaliação por meio de programas estatísticos ou preferencialmente por meio do Cálculo da Média Acumulada, proposta por Williams (1977). Para a Visualização e Editoração de imagens existem vários programas disponíveis, dentre eles, o *Adobe Photoshop*, *ACDsee*, *PicaViewer* e até mesmo o editor de imagens do próprio KS.

O pesquisador deve estar sempre atento quanto à ocorrência de viés (bias) ou erros de observação que só podem ser excluídos com a criteriosa escolha do preparado a ser analisado e da técnica conveniente de morfometria.

Deve-se salientar que o emprego da morfometria evidentemente não invalida as consagradas técnicas de morfologia clássica, ou mesmo da análise qualitativa e semi-quantitativa empregadas pelos morfologistas e patologistas. A finalidade das técnicas de morfometria é de tornar mais objetiva e rápida a apresentação e a tabulação dos resultados obtidos em pesquisas e mesmo na rotina diagnóstica. A aplicação desta metodologia melhora a capacidade do patologista estabelecer o diagnóstico e freqüentemente até mesmo o prognóstico de alguns processos patológicos estudados.

### **1.9. CITOLOGIA VAGINAL**

A citologia vaginal baseia-se na resposta do epitélio vaginal ao estímulo hormonal, principalmente estrogênios e progesterona. Tal observação é considerada um meio indireto de avaliação da função ovariana e do estado hormonal do indivíduo (Piazza, 1996; Faria, 2000; Lustosa *et al*, 2002).

Pode ser estudada sob duas formas: a avaliação cito-hormonal isolada e/ou a curva citológica hormonal; em ambos, são identificadas as principais camadas do epitélio vaginal (células parabasais, células intermediárias e células superficiais) (Wright *et al*, 2002). É realizada, então, a análise qualitativa (verificação das características morfológicas e a disposição celular) e a análise quantitativa (número de células) da amostra. Quando necessário, pode ser fornecido o índice de Frost que é a análise percentual de cada tipo de células do esfregaço (Frost, 1961; Rodrigues, Silva, 1977; Wied, Bibbo, 1997).

Dentre os vários índices que existem para classificar as influências hormonais no epitélio vaginal, os mais utilizados são o índice de maturação celular, o índice de cariopcnose e o de eosinofilia. Porém, dependem da variação citológica individual do epitélio e da interpretação pessoal de diferentes observadores. O índice de maturação celular ou de Frost parece ser o mais informativo de todos e consiste na determinação de células profundas, intermediárias e superficiais (P/I/S), expressas em porcentagem (Wright, 2002).

O índice de maturação sofre desvio à esquerda após a menopausa, com predomínio de células parabasais, situação que pode ser mudada com a administração de estrogênio.

Além das classificações quantitativas, baseadas na concentração celular, nas avaliações percentuais, como o índice de Frost, há também a descrição de Bethesda, na qual não há terminologia classificatória, mas procede-se ao estudo

geral do esfregaço. Neste, cita-se a compatibilidade ou não do padrão celular encontrado, com o dia do ciclo ou a faixa etária, evitando-se ao máximo a subjetividade e emitindo-se laudos condizentes com a condição hormonal.(Carvalho,1993).

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)

Poucos foram os trabalhos que analisaram os efeitos dos fitomedicamentos no endométrio e na citologia vaginal de ratas *Wistar* ooforectomizadas. Assim, foi objetivo de nosso estudo observar os efeitos do *Trifolium pratense* e da *Cimicifuga racemosa* nestes tecidos, em doses padronizadas para seres humanos, simulando as condições encontradas na utilização destes compostos para mulheres após a menopausa e comparando-os com os efeitos do estradiol. Para tal analisamos a atividade hormonal através do estudo imunistoquímico de receptores estrogênicos e do fator de proliferação celular Ki67 no endométrio de ratas *Wistar*, verificando ainda o índice de maturação celular na citologia vaginal destes animais.

## **2. OBJETIVO**

Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão dos receptores estrogênicos e da proteína Ki67 no endométrio de ratas *Wistar* ooforectomizadas antes e após reposição com valerato de estradiol, extratos de *Cimicifuga racemosa* e *Trifolium pratense*, bem como a avaliação da citologia vaginal.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Animais de experimentação

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) fêmeas, pesando entre 200 e 300 gramas de peso, com idade entre 10 e 12 semanas de vida. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22° a 24°C) e luminosidade natural. Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito, sendo a dieta normoprotéica (Anexo 1). Os animais foram divididos em cinco grupos:

**Grupo 0 Simulação (Sham)** – Ratas nas quais foi executada laparotomia mas não foram submetidas à ooforectomia, observadas por quatro semanas (n= 7). Este grupo objetivou apenas observar as condições cirúrgicas e ambientais dos animais testados

**Grupo 1 – Ooforectomia sem suplementação hormonal.** As ratas deste grupo foram submetidas à ooforectomia bilateral e, três semanas após, foi realizada apenas introdução de 0,5 ml de água filtrada diariamente por quatro semanas (n=8).

**Grupo 2 – Ooforectomia com suplementação hormonal com Valerato de Estradiol.** As ratas deste grupo foram submetidas à ooforectomia bilateral e, três semanas após, foi iniciada a suplementação com valerato de estradiol na dose equivalente a 2 mg por dia em humanos de 70 kg de peso, por quatro semanas (n=8)

**Grupo 3 - Ooforectomia com suplementação de *Cimicifuga racemosa*.** As ratas deste grupo foram submetidas à ooforectomia bilateral e, três semanas após, foi feita

a suplementação com *Cimicifuga racemosa* na dose equivalente a 4 mg de deoxiacetina por dia em humanos de 70 kg de peso, por quatro semanas (n=8). (Anexo 1)

**Grupo 4 –Ooforectomia com suplementação de *Trifolium pratense*.** Mesmo procedimento do grupo 3, substituindo o fitoterápico pelo *Trifolium pratense*, na dose equivalente a 80 mg de isoflavonas por dia em humanos de 70 kg de peso, (n=8). (Anexo 2)

Todos os animais foram tratados segundo os princípios éticos de experimentação, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição. (anexo 4)

A parte experimental foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro e complementada no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa da Misericórdia de São Paulo.

## **3.2. SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL**

### **3.2.1. Ooforectomia bilateral**

As ratas foram anestesiadas com cloridrato de quetamina (50mg/Kg, Ketalar®, Parke-Davis®) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum®, Bayer®) e colocadas em decúbito dorsal. Foi realizada uma incisão mediana, com localização

de ovários e trompas, sendo executada ligadura e secção de ovidutos e vasos nutridores bilateralmente, seguida da remoção dos ovários e síntese da parede abdominal . (Tempo 1)

Após o intervalo de 21 dias para supressão total dos efeitos dos hormônios endógenos no organismo, foi iniciada a suplementação com as substâncias de experimentação ou placebo (Tempo 2).

### **3.2.2. Suplementação hormonal**

A suplementação foi realizada por gavagem, utilizando-se sonda de nelaton nº 7 após sedação do animal com éter etílico em câmara de éter, durante o período de 28 (vinte e oito) dias (Tempo 3). Os suplementos foram diluídos de forma homogênea e preparados segundo especificações da Farmácia da Faculdade de Farmacologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As doses diárias foram acondicionadas em volume de 0,5 ml por dia. Os animais foram pesados uma vez por semana para monitoramento de toxicidade e para ajuste de dose de acordo com o peso, se necessário, respeitando-se o limite de entre 200 e 300 g de peso para manutenção da dose. As eventuais alterações de dose fora destes limites seriam feitas de forma proporcional à variação apresentada.

### **3.2.3. Citologia vaginal**

A citologia vaginal foi avaliada por esfregaço vaginal retirado por escovinha com soro fisiológico, sendo feito o esfregaço em lâmina de vidro e conservado com fixador. Esta colheita foi feita imediatamente antes do início da suplementação (T2) com os medicamentos e no dia do sacrifício dos animais (T3). No grupo que não sofreu intervenção cirúrgica, a colheita foi feita ao início (T1) e ao final do período de observação (T3).

As lâminas que receberam o esfregaço vaginal foram coradas pelo método de Papanicolaou e a análise feita sob microscópio ótico, visando observar a intensidade de maturação do epitélio.

### **3.2.4. Preparação dos tecidos**

Vinte e quatro horas após o último dia de suplementação, os animais foram sacrificados por asfixia em câmara fechada com éter (T3). Na realização da necropsia, o útero foi retirado e fixado em formol a 10%. A peça foi enviada para estudo morfológico, imunoistoquímico e morfométrico, visando analisar e quantificar o estímulo hormonal recebido pelo órgão.

### 3.3. MÉTODO HISTOPATOLÓGICO

Após fixação em solução de formaldeído tamponado a 10% pelo período médio de 24 horas, o material de estudo foi emblocado em parafina segundo as normas habituais do Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP. Os fragmentos de endométrio recebidos foram divididos em quatro quadrantes traçando-se duas linhas imaginárias em local correspondente às doze e três horas de marcador de relógio. Os quadrantes foram numerados de um a quatro no sentido horário, sendo realizados cortes seqüenciais e os fragmentos obtidos foram colocados em blocos separados.

Os fragmentos foram desidratados em álcool etílico, clareados pelo xilol e embebidos em parafina, sendo então confeccionados os blocos; estes foram cortados por meio de micrótomo calibrado a 4  $\mu$ m de espessura. Os cortes histológicos obtidos, após colocação em lâmina, foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina e, então, realizada a leitura em microscópio óptico comum. Os laudos foram emitidos de acordo com a padronização do Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP. Foi considerado endométrio atrófico aquele apresentando glândulas tubulares com uma única camada de células com borda nítida sem figuras de mitose. Foi considerado endométrio trófico aquele apresentando glândulas tubulares com pseudo-estratificação e presença de mitoses (Kurman, 1987).

### 3.4. MÉTODO IMUNOISTOQUÍMICO

Para a realização da técnica de imunohistoquímica destinada a avaliar as células endometriais, foram selecionados os blocos de parafina com áreas mais representativas do tecido em questão.

Os blocos de parafina selecionados foram encaminhados ao laboratório ANTICORPOS, para o devido processamento dos cortes histológicos visando à coloração imunohistoquímica.

Foram realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura e montados em lâmina de vidro, previamente lavadas com solução sulfocrômica, e preparadas com o adesivo a base de poli-L-lisina (Poly-L-Lisine – marca Sigma, USA, cod. P8920) a 10% para evitar o descolamento dos mesmos durante a imunocoloração, sendo colocadas em estufa a 60 °C por 12 horas para melhor aderência da amostra à lâmina. Em seguida, foi feita a identificação de cada lâmina a ser utilizada para cada anticorpo e retornaram à estufa por mais 20 minutos a 60 °C; logo após, as mesmas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol de 5 minutos cada à temperatura ambiente e em três banhos de álcool etílico em diferentes concentrações: o primeiro a 95% e o segundo a 75% e o terceiro a 50%, por cinco minutos cada banho. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada durante cinco minutos e tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% e metanol a 70% durante 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena, sofrendo novo banho de água destilada. A seguir, procedeu-se a lavagem da lâmina por 2,5 minutos com solução-tampão em câmara de pressão PASCAL, preparando a amostra para receber a reação imunohistoquímica; para a lâmina do anticorpo RE (diluição 1:250) foi utilizado

o tampão EDTA/TRIS com pH igual a 9.0 e para o anticorpo Ki67 (diluição 1:30) utilizamos tampão citrato de sódio a 0,01 M com pH igual a 6,0.

Para verificação dos RE, foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo Clone 1D5, específico para receptores  $\alpha$ -estrogênicos (número de código: M7047, *DakoCytomation, DAKO Corporation*) e, para a identificação da proteína Ki67, utilizou-se o anticorpo monoclonal Clone MIB-5 (número de código: M7248, *DakoCytomation, DAKO Corporation*).

Na preparação para os receptores estrogênicos, a técnica utilizada foi a denominada Técnica ABC; esta emprega anticorpos primários não marcados seguido de um anticorpo secundário biotilado e a adição do complexo Avidina-Biotina peroxidase que será identificado pela coloração de peroxidase. Este procedimento é baseado na afinidade da Avidina (glicoproteína 68kD) com a biotina que é uma vitamina de baixo peso molecular. Quando utilizamos enzimas biotiladas, formam-se complexos altamente estáveis para identificação das substâncias a serem avaliadas (Hsu et al, 1981).

As lâminas foram, então, lavadas com água destilada e colocadas em tampão PBS (pH de 7,4) com TWIN20 (Sigma código P7949) para diminuir a coloração de fundo (background); nesta fase, utilizamos três banhos de cinco minutos cada. A seguir, os cortes foram circundados por caneta hidrofóbica (marca DAKO código S2002) para evitar que a solução com o anticorpo diluído escorresse para fora dos limites da lâmina, sendo incubadas com os anticorpos diluídos em solução de PBS-

TWIN20 + BSA (albumina bovina marca Sigma código A9647) a 1%; esta solução visa o bloqueio das proteínas inespecíficas.

Após uma hora em temperatura ambiente, aplicamos o kit Easy-Path ABC Universal (EP-ABCu, *Super ABC Kit*, *Easy Path*) consistindo de Avidina DH e enzima biotinizada. Foi feita nova lavagem por 10 minutos em solução tampão PBS-TWIN20 e adicionamos o cromógeno DAB (marca DAKO código k3468 por 30 segundos a um minuto em média, sendo os núcleos celulares corados em castanho. Foi feita nova lavagem por 5 minutos em água destilada e feita a contracoloração com Hematoxilina de Harris por um minuto em temperatura ambiente; este corante visa corar núcleos em azul para revelar a morfologia do tecido). Realizamos a lavagem da lâmina em água corrente e desidratamos com álcool em concentrações crescentes a 50%, 70%, 90% e PA (álcool puro) e, depois, com quatro banhos de xilol. Foi feita a montagem das lâminas com fixação de lamínulas por goma de Damar (*Proquímios*) para observação ao microscópio. Todas as diluições dos reagentes respeitaram as indicações e limites recomendados pelo fornecedor do produto.

A técnica para identificação da proteína Ki67 seguiu os mesmos passos da utilizada para os RE, modificando-se apenas os anticorpos específicos.

### 3.5. MÉTODO MORFOMÉTRICO

Cada lâmina preparada pela reação de imunistoquímica para RE e Ki67 foi avaliada no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por meio de microscópio de luz (Axioskop 40 – Zeiss), com objetiva de 400 vezes de aumento, sendo adaptado a microcâmara digital e monitor de vídeo (LG Flatron 14 polegadas). Para cada lâmina foram analisados e fotografados no mínimo 5 campos aleatórios e posteriormente analisados em programa de análise de imagem *Image Pro Plus DEMO 4.0*, utilizando-se a média dos resultados obtidos. A contagem da área marcada com Ki67 foi correlacionada com área total (per área), e expressa em porcentagem. A contagem das células marcadas com RE foi feita manualmente (*tag points*) e correlacionada com o número de células não marcadas, também expressa em porcentagem. (Carvalho, 2006)

### 3.6. MÉTODO ESTATÍSTICO

Foi utilizado o programa *Microsoft Excel 2003* para arquivamento de informações e contagem de campos: pacote estatístico *SPSS for Windows* para a análise estatística dos dados.

- para analisar o comportamento do peso ao longo do tempo (três avaliações) separadamente por grupo experimental foi realizada a Análise de Variância para medidas repetidas. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni (ajustado para três medidas repetidas) foi aplicado para identificar quais os momentos que diferem entre si;

- para comparação do peso (g) entre cinco grupos foi realizada a Análise de Variância “*one-way*” (ANOVA para um fator) e aplicado o teste comparações múltiplas de Tukey, para identificar quais os grupos que diferem entre si;

- para comparação do percentual de marcadores imunoistoquímicos (RE e Ki-67) e do índice de maturação celular (Índice de Frost) entre quatro grupos experimentais foi realizada a ANOVA de Kruskal-Wallis (não-paramétrica), esta pois os percentuais de células não apresentaram distribuição normal (distribuição Gaussiana). Na identificação dos grupos que diferem entre si, foi utilizado o teste de comparações múltiplas não paramétrico baseado na estatística de Kruskal-Wallis.

O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%. A análise estatística foi processada pelo *software* SAS 6.04.

## **4. RESULTADOS**

#### 4. 1. PESO INICIAL E FINAL DOS ANIMAIS EM ESTUDO

Analizamos a variação do peso dos animais (Anexo 3) imediatamente antes da ooforectomia (Tempo 1), quando do início da suplementação (Tempo 2) e ao final da suplementação das substâncias por gavagem (Tempo 3).

Na Tabela 1, observamos a média, o desvio padrão (DP) do peso dos animais para os três momentos estudados de cada grupo e o correspondente nível descritivo ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 1** Análise da variação dos pesos de cada grupo em cada tempo de experimentação - Laboratório de Cirurgia Experimental – UFRJ

Grupo	Momento	n	Média	D.P.	p valor <sup>a</sup>	diferenças significativas <sup>b</sup>
0 (simulação)	Tempo 1	7	238,1	14,1	0,11	
	Tempo 2	7	233,6	11,2		
	Tempo 3	7	224,0	10,7		
1 (placebo)	Tempo 1	8	241,4	18,3	<b>0,010</b>	Tempo 1 ≠ Tempo 2
	Tempo 2	8	261,0	26,6		Tempo 1 ≠ Tempo 3
	Tempo 3	8	254,5	22,2		
2 (estradiol)	Tempo 1	8	258,9	14,6	<b>0,0001</b>	Tempo 1 ≠ Tempo 3
	Tempo 2	8	258,5	18,6		Tempo 2 ≠ Tempo 3
	Tempo 3	8	281,3	18,1		
3 (Cimicifuga)	Tempo 1	8	249,9	19,0	0,36	
	Tempo 2	8	245,8	25,4		
	Tempo 3	8	263,0	31,9		
4 (Trifolium)	Tempo 1	8	242,5	17,6	0,57	
	Tempo 2	8	246,8	22,5		
	Tempo 3	8	236,1	28,9		

D.P.:desvio padrão

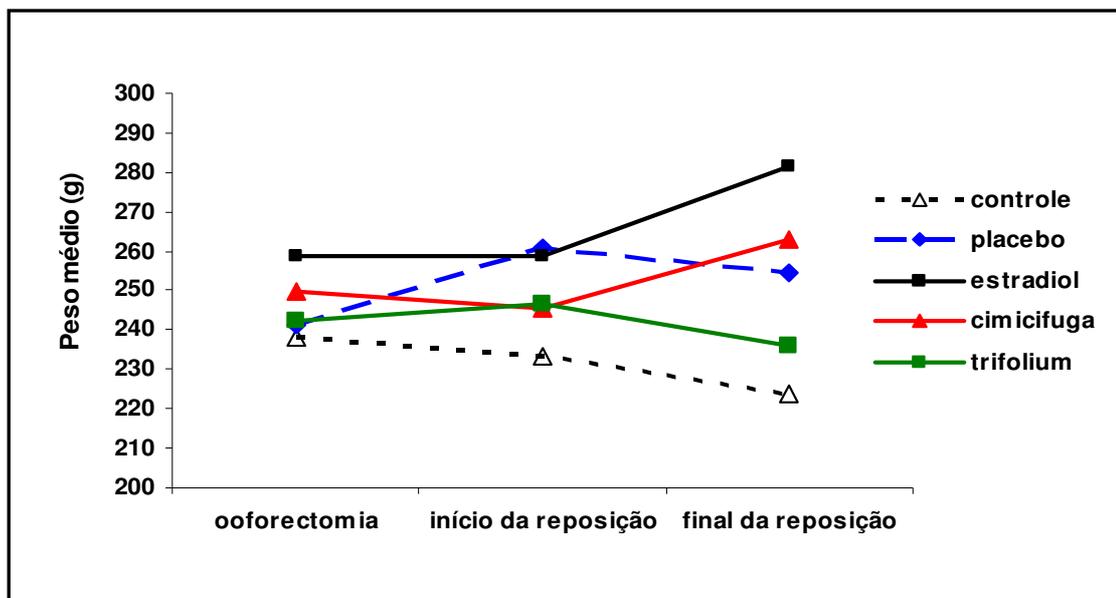
<sup>a</sup> p valor da ANOVA para medidas repetidas para o peso (g)

<sup>b</sup> comparações múltiplas de Bonferroni ajustado para três momentos, ao nível de 5%. (P < 0,05)

Tempo 1: ooforectomia; Tempo 2: início da reposição; Tempo 3: final da reposição

Observou-se que existe variação significativa no peso ao longo do tempo para o Grupo 1 ( $p = 0,01$ ) e Grupo 2 ( $p = 0,0001$ ). No Grupo 1, o Tempo 1 foi significativamente menor que nos Tempos 2 e 3; e no Grupo 2, os Tempos 1 e 2 apresentaram peso médio significativamente menor que no Tempo 3. Não existe variação significativa no peso nos demais grupos.

A Figura 1 ilustra a variação do peso médio ao longo do tempo, nos diferentes grupos estudados.



**FIGURA 1.** Variação do peso médio ao longo do tempo de estudo (Laboratório de Cirurgia Experimental – UFRJ)

Existe diferença significativa no peso do Tempo 3 (final da reposição) entre os grupos experimentais ( $p = 0,0004$ ). O Grupo 0 (simulação) apresentou peso médio significativamente menor que os Grupos 1 (placebo), 2 (estradiol) e 3 (*Cimicífuga*); e o Grupo 2 (estradiol) foi significativamente maior que o Grupo 4 (*Trifolium*).

Houve diferença significativa na variação absoluta ( $p = 0,003$ ) e relativa ( $p = 0,004$ ) dos pesos entre os grupos experimentais. O Grupo 2 (estradiol) apresentou aumento do peso absoluto (g) e relativo (%) significativamente maior, em comparação com os Grupos 0 (simulação), 1 (placebo) e 4 (*Trifolium*).

A Tabela 2 e a Figura 2 fornecem a média e o desvio padrão do peso nos três tempos do experimento, da variação absoluta do peso (g) e relativa (%) entre o início e o final da reposição e os respectivos níveis descritivos ( $p$  valor). Os grupos que diferiram significativamente, foram descritos na coluna de “diferenças significativas”.

**TABELA 2.** Variação do peso (gramas) dos diferentes grupos estudados (Laboratório de Cirurgia Experimental – UFRJ)

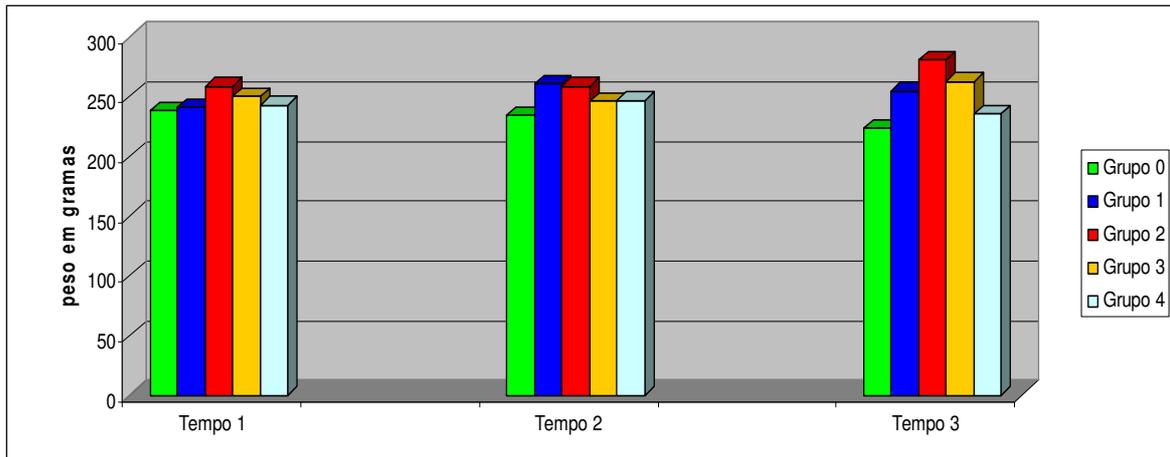
Variável	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	$p$ valor	diferenças significativas <sup>b</sup>
	Peso (g)	Peso(g)	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)		
	média ± DP						
<b>Tempo 1</b>	238 ± 14	241 ± 18	259 ± 15	250 ± 19	243 ± 18	0,13	
<b>Tempo 2</b>	234 ± 11	261 ± 27	259 ± 19	246 ± 25	247 ± 23	0,12	
<b>Tempo 3</b>	224 ± 11	255 ± 22	281 ± 18	263 ± 32	236 ± 29	<b>0,0004</b>	Grupo 0 ≠ Grupo 1, 2 e 3 Grupo 2 ≠ Grupo 4

<sup>a</sup>  $p$  valor da ANOVA "one-way" entre os cinco grupos experimentais

<sup>b</sup> comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5%.

Peso 1: ooforectomia; Peso 2: início da reposição; Peso 3: final da reposição

Deltas absoluto (g) e relativo (%) são respectivos aos pesos 2 e 3.

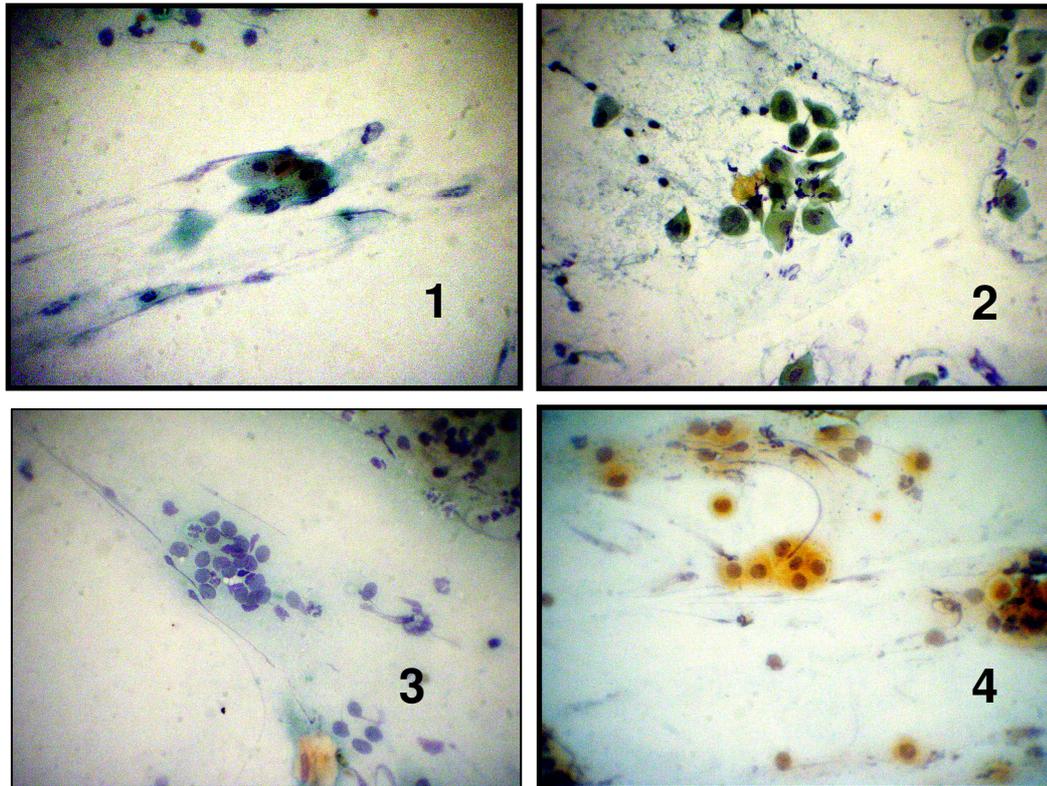


Grupo 0: Simulação, Grupo 1: Placebo, Grupo 2: Estradiol, Grupo 3: *Cimicífuga*, Grupo 4: *Trifolium*  
Tempo 1: Dia da realização da ooforectomia; Tempo 2: início da reposição ; Tempo 3: final da reposição  
Tempo 1:  $p < 0,13$ , Tempo 2:  $p < 0,12$ , Tempo 3:  $p < 0,0004$   
 $P < 0,05$ ; Grupo 0  $\neq$  1,2 e 3, e Grupo 2  $\neq$  4 no Tempo 3

**FIGURA 2** Variação do peso em gramas nos diferentes grupos estudados (Laboratório de Cirurgia Experimental – UFRJ)

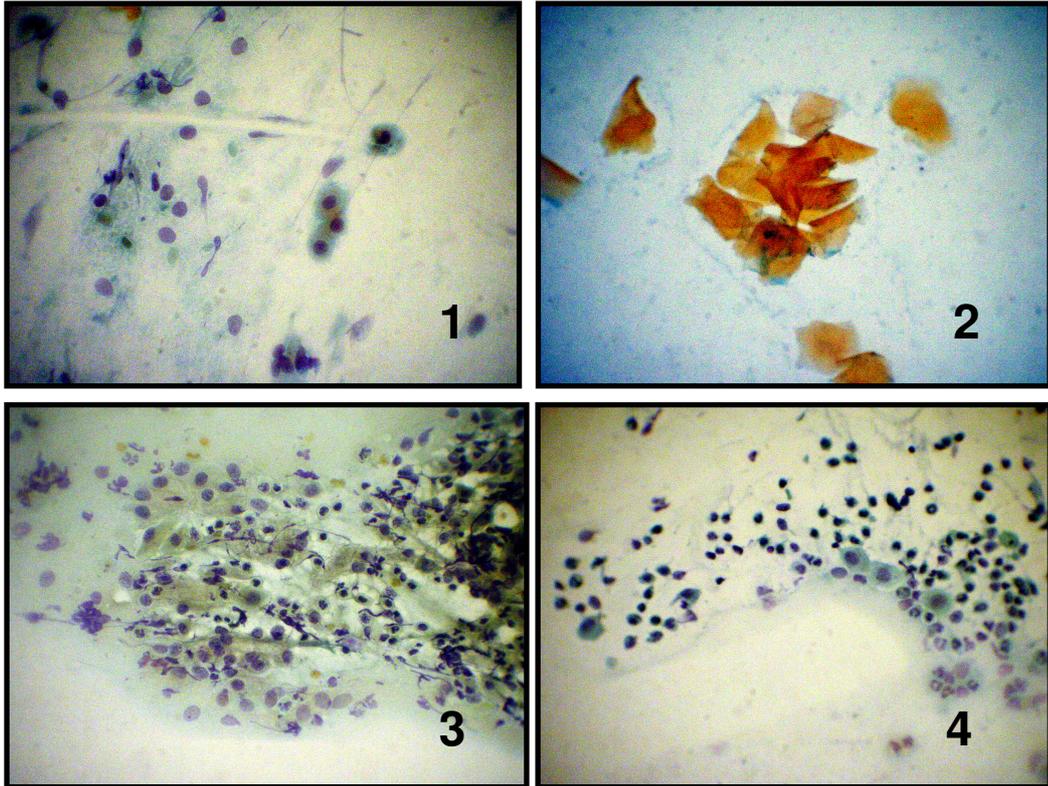
## 4.2. CITOLOGIA VAGINAL

Ao avaliarmos os esfregaços vaginais obtidos antes do início da suplementação de substâncias (T2), observamos que todas as ratas apresentaram citologia atrófica.



**FIGURA 3** Esfregaço de epitélio vaginal de rata antes do tratamento (T2) mostrando citologia atrófica em todos os grupos pela técnica de Papanicolaou. Fotomicrografias (100X) – Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

Após a suplementação (T3), observamos que o esfregaço permaneceu atrófico nos grupos placebo (1), *Cimicifuga* (3) e *Trifolium* (4). No grupo que recebeu valerato de estradiol (2) ocorreu aumento do índice de células intermediárias e superficiais, de acordo com o índice de Frost.



**Figura 4** Esfregaço de epitélio vaginal de rata após o tratamento (T3) no Grupo 1 (placebo), Grupo 2 (estradiol), Grupo 3 (Cimicifuga) e Grupo 4 (*Trifolium*), mostrando citologia atrófica em todos os grupos exceto no grupo estradiol pela técnica de Papanicolaou (100X) – Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

Em relação às células parabasais, houve maior incidência no Grupo 1 (placebo). Esta quantidade não foi significativamente diferente do Grupo 4 (*Trifolium*). Quando analisamos estas células nos Grupos 2 (estradiol) e 3 (*Cimicífuga*), observamos que os valores são significativamente menores que os do grupo placebo.

No estudo das células intermediárias, observamos o número é semelhante nos Grupos 1 (placebo) e 4 (*Trifolium*). Ocorreu um aumento significativo no Grupo 2

(estradiol). No Grupo 3 (Cimicifuga), verificamos um aumento das células intermediárias significativamente maior que nos Grupos 1 e 4.

Ao observarmos as células superficiais, só verificamos uma variação significativa no Grupo 2 (estradiol); todos os outros grupos apresentaram índices mais baixos, sem diferenças significativas entre si (Tabela 3).

**TABELA 3.** Análise estatística do Índice e Frost entre os grupos – Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

Variável	Grupo	n	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	p valor <sup>a</sup>	diferenças significativas <sup>b</sup>
células parabasais	1	8	78,8	24,2	<b>90,0</b>	20	90	<b>0,010</b>	Grupo 1 ≠ Grupo 2 e 3 Grupo 2 ≠ Grupo 4
	2	8	31,9	24,2	<b>35,0</b>	0	80		
	3	8	43,8	28,8	<b>55,0</b>	0	80		
	4	8	67,5	41,7	<b>90,0</b>	0	90		
células intermediárias	1	8	20,0	20,7	<b>10,0</b>	10	70	<b>0,019</b>	Grupo 1 ≠ Grupo 2 Grupo 2 ≠ Grupo 4
	2	8	49,4	25,6	<b>60,0</b>	5	80		
	3	8	35,0	14,1	<b>42,5</b>	15	50		
	4	8	17,5	21,2	<b>10,0</b>	10	70		
células superficiais	1	8	1,3	3,5	<b>0,0</b>	0	10	<b>0,021</b>	Grupo 1 ≠ Grupo 2
	2	8	18,8	31,1	<b>5,0</b>	5	95		
	3	8	20,6	36,7	<b>0,0</b>	0	80		
	4	8	15,0	32,1	<b>0,0</b>	0	90		

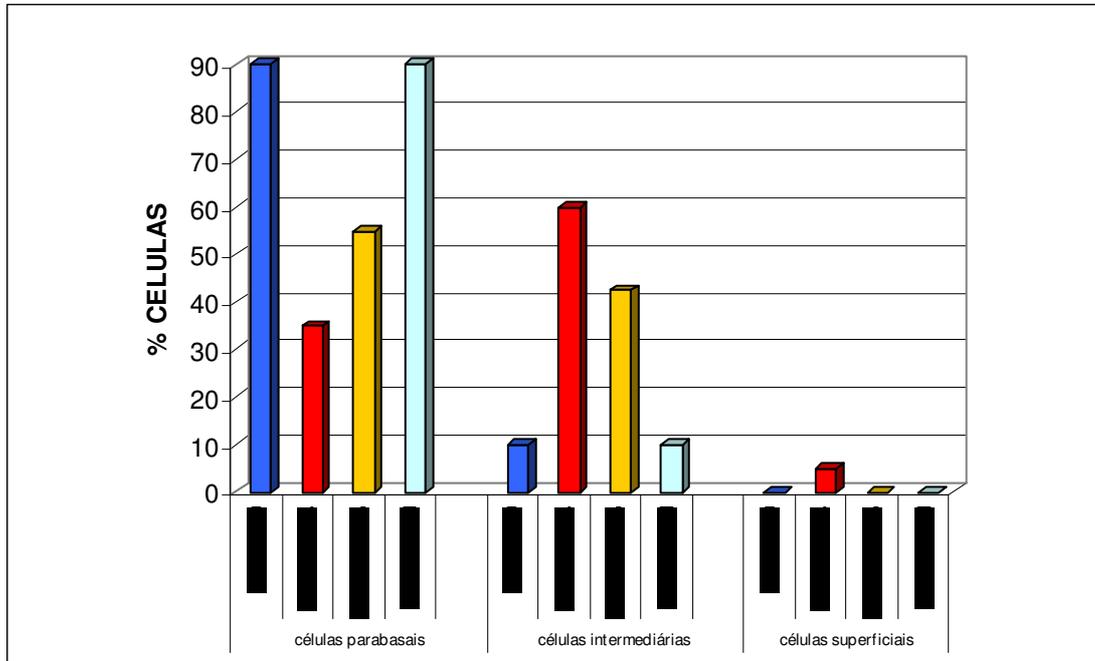
D.P.:desvio padrão

<sup>a</sup> p valor da ANOVA de Kruskal-Wallis

Grupo 1: Placebo, Grupo 2: Estradiol, Grupo 3: *Cimicifuga*, Grupo 4: *Trifolium*

<sup>b</sup> comparações múltiplas não paramétrica de Kruskal-Wallis, ao nível de 5%.

A Figura 5 apresenta a variação dos tipos celulares do epitélio vaginal de acordo com o seu percentual após a suplementação com cada substância.



Células parabasais  $p < 0,01$ , células intermediárias  $p < 0,019$ , células superficiais  $p < 0,021$

células parabasais: grupo 1  $\neq$  2 e 3, grupo 2  $\neq$  4

células intermediárias: grupo 1  $\neq$  2, grupo 2  $\neq$  4

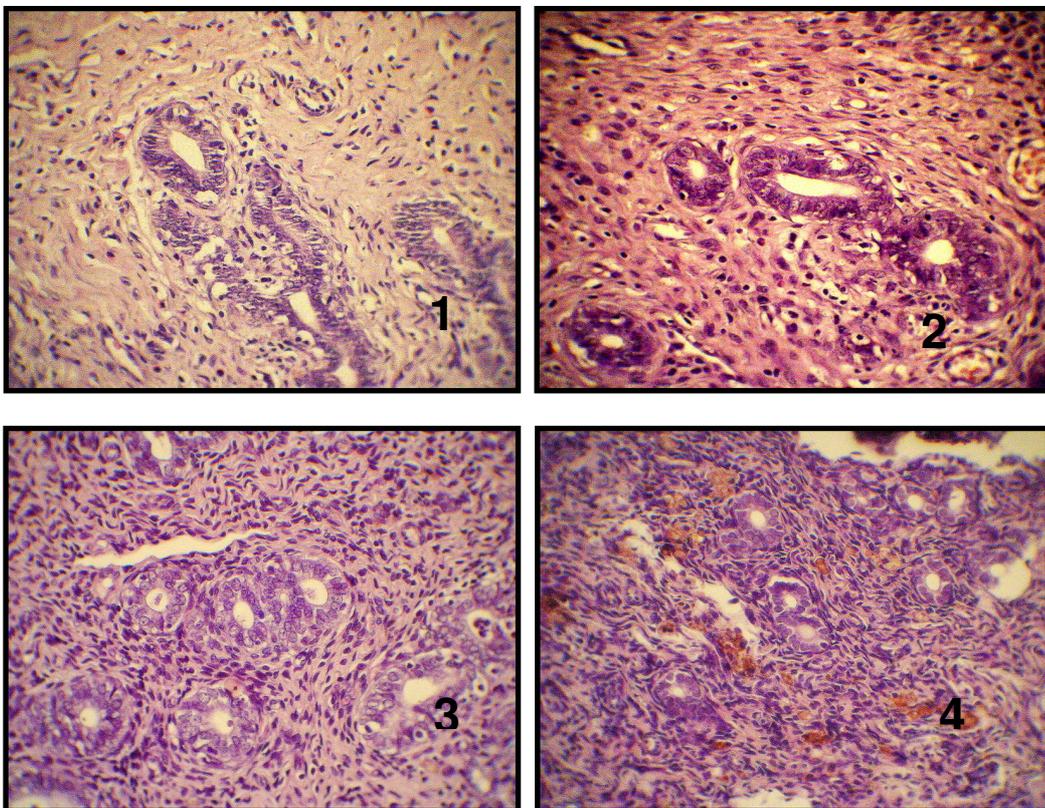
células superficiais: grupo 1  $\neq$  2

**FIGURA 5** Percentual médio de cada tipo celular em epitélio vaginal de ratas ooforectomizadas após as diferentes suplementações (Tempo 3) – Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

### 4.3. HISTOLOGIA

Os cortes de endométrio, obtidos após a suplementação de substâncias (T3), foram corados com hematoxilina-eosina.

Nos Grupos 1 (placebo), 3 (*Cimicifuga*) e 4 (*Trifolium*), o endométrio permaneceu atrófico. No Grupo 2 (estradiol), houve crescimento glandular com várias figuras de mitose, caracterizando endométrio proliferativo (Kurmann, 1987).

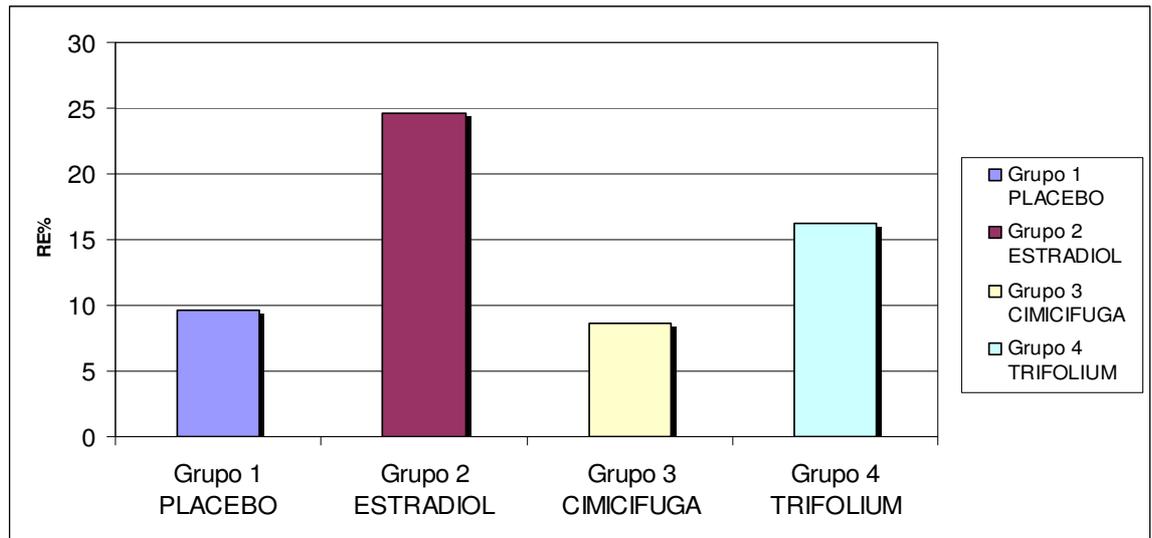


**Figura 6** Cortes histológicos de endométrio do útero de ratas ooforectomizadas corados com hematoxilina-eosina, após suplementação de placebo (1), estradiol (2), Cimicifuga (3) e Trifolium (4). Observamos endométrio proliferativo em 2 e endométrio atrofico em 1,3 e 4. Fotomicrografia 400X– Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

#### 4.4. Receptores de Estrogênio (RE) e Proteína Ki67 em endométrio

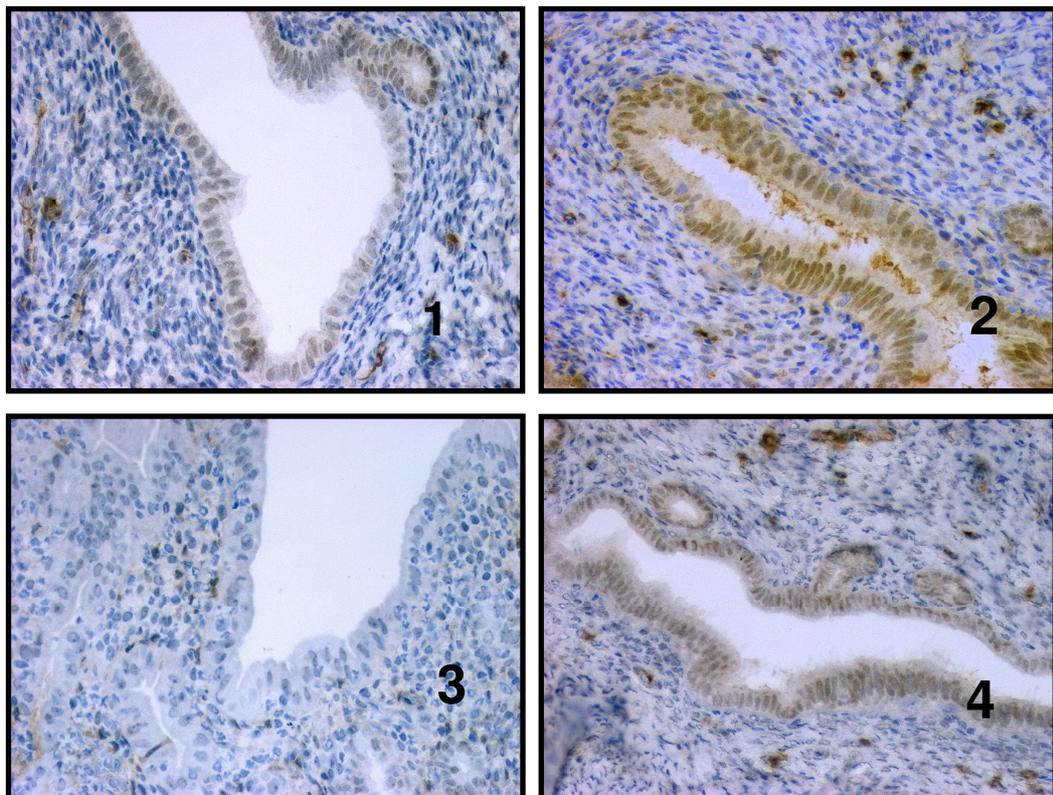
Foram analisados os dados percentuais de manifestação dos receptores estrogênicos e da proteína Ki67 no endométrio dos diferentes grupos de estudo.

A análise percentual da expressão dos receptores de estrogênio (RE) no endométrio após a suplementação (T3) demonstrou que houve diferença significativa nos Grupos estradiol (2), *Cimicifuga* (3) e *Trifolium* (4), quando comparados ao placebo. Quando comparamos os Grupos 2 e 3, observamos que a diferença foi significativa, havendo uma expressão maior no endométrio estimulado por estradiol (Grupo 2). Quando comparamos os Grupos 2 e 4 observamos que a diferença também foi significativa, havendo uma expressão maior no endométrio estimulado por estradiol (Grupo 2). Ao compararmos os Grupos 3 e 4, observamos que houve uma estimulação endometrial significativamente maior pelo Grupo 4 (*Trifolium*) em relação ao Grupo 3 (*Cimicifuga*). (Figuras 7, 8 e 9 e Tabela 4)



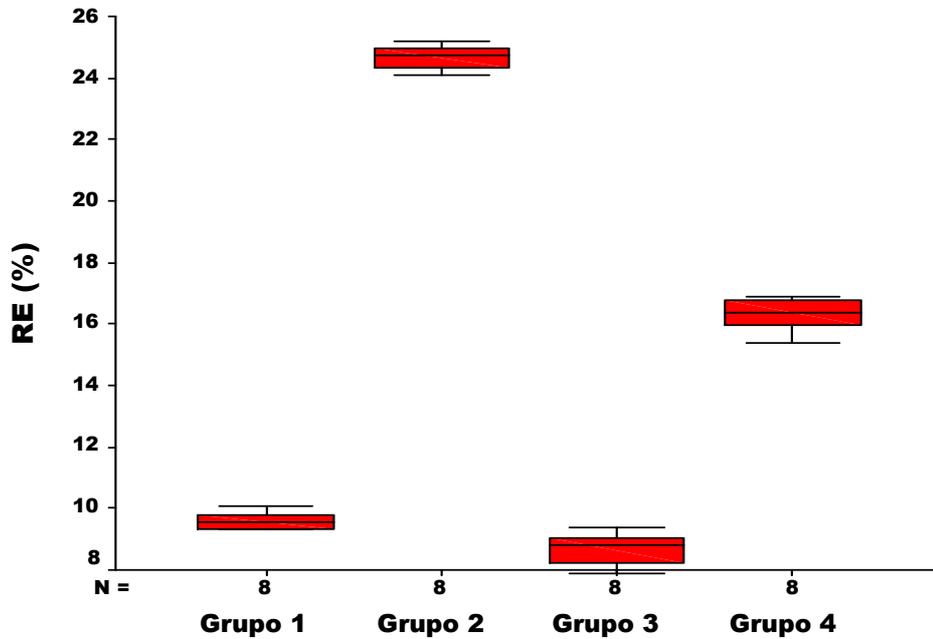
P valor = 0,0001  
 Grupo 1 ≠ 2, 3 e 4; Grupo 2 ≠ 3 e 4; Grupo 3 ≠ 4

**Figura 7** Histograma da expressão individual de receptores estrogênicos no endométrio de ratas ooforectomizadas, após diferentes suplementações– Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

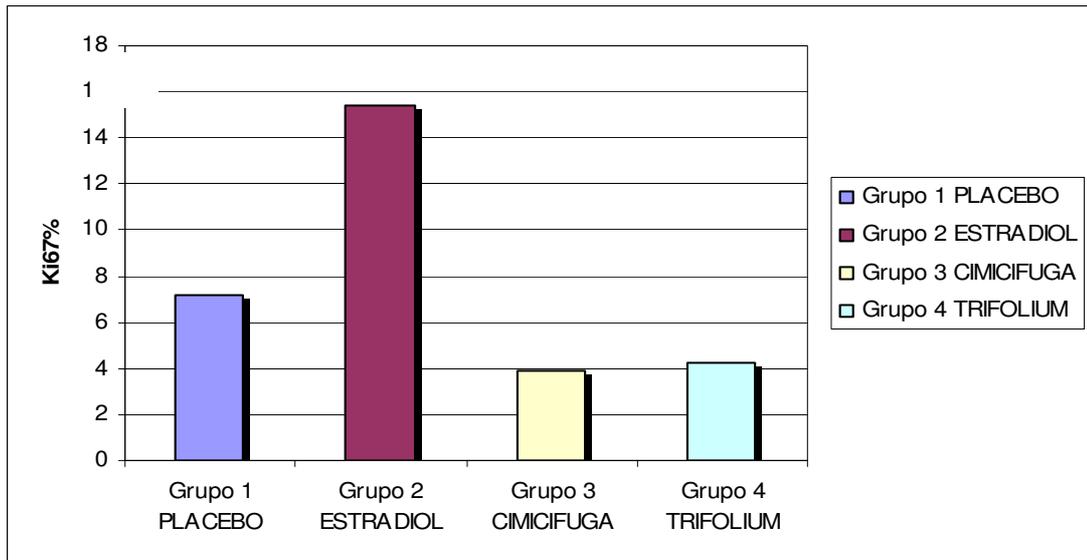


**FIGURA 8** Corte histológico de endométrio de ratas ooforectomizadas apresentando a imunoexpressão de receptores estrogênicos após suplementação com placebo (1), estradiol (2), *Cimicífuga* (3) e *Trifolium* (4). (400X) – Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

**FIGURA 9** Gráfico da expressão de RE segundo os grupos estudados–  
Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de  
São Paulo



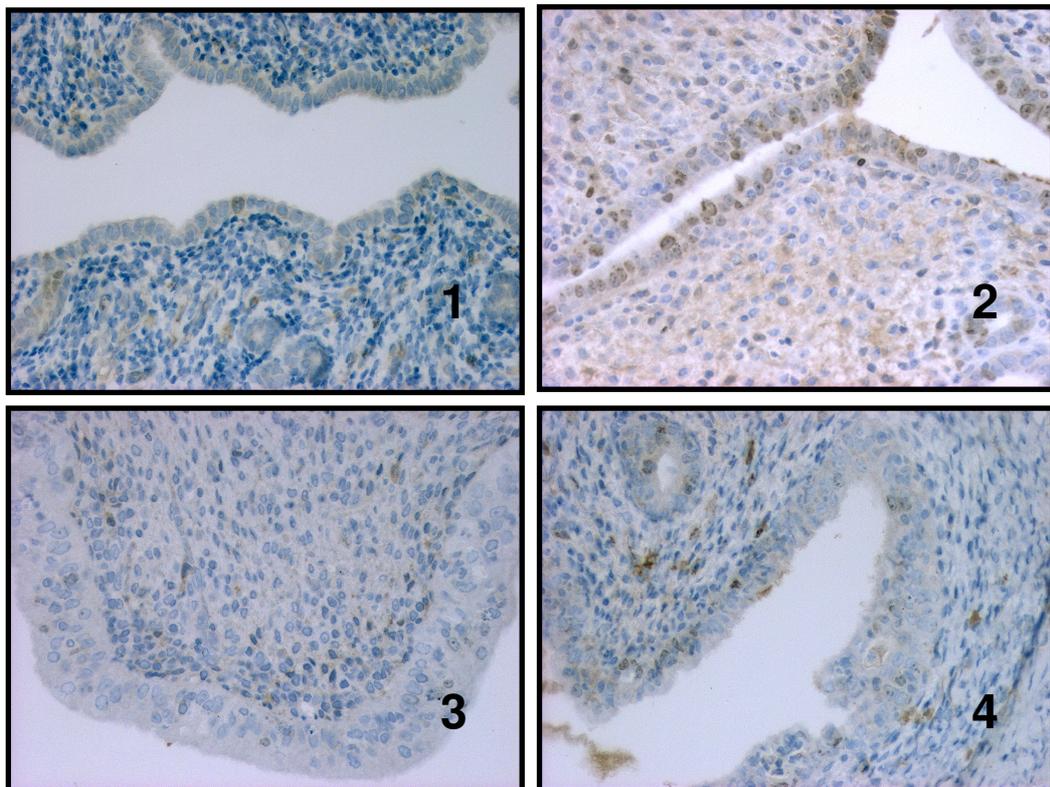
Quanto à análise da expressão dos receptores de Ki67 no endométrio após a suplementação (T3), observamos que, quando comparados ao Grupo 1 (placebo), houve diferença significativa entre todos os grupos. Ao compararmos o Grupo 1 (placebo) com o Grupo 2 (estradiol), observamos um aumento significativo da expressão desta proteína no Grupo 2. Quando comparamos o Grupo 1 (placebo) com os Grupos 3 (*Cimicifuga*) e 4 (*Trifolium*), evidenciamos uma expressão menor da proteína Ki67 em relação ao Grupo 1 (placebo). Embora a diferença seja pequena, a expressão no grupo 4 (*Trifolium*) é significativamente maior que a obtida no Grupo 3 (*Cimicifuga*) (Figuras 10, 11 e 12 e Tabela 4)



P valor 0.0001

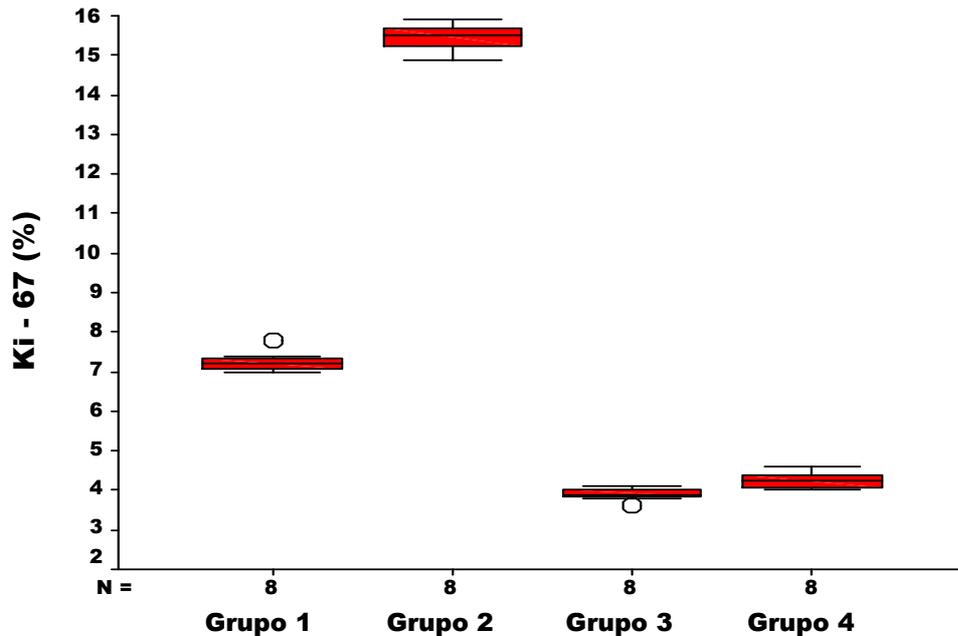
Grupo 1 ≠ 2, 3 e 4; Grupo 2 ≠ 3 e 4; Grupo 3 ≠ 4

**Figura 10** Histograma da expressão percentual de proteína Ki67 no endométrio de ratas ooforectomizadas após diferentes suplementações– Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo



**Figura 11** Corte histológico de endométrio de ratas ooforectomizadas apresentando a imunoexpressão da proteína Ki67 após suplementação com placebo (1), estradiol (2), *Cimicifuga* (3) e *Trifolium*(4) – Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

**FIGURA 12** Gráfico da expressão dos receptores Ki67 nos grupos estudados–  
Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São  
Paulo



Variável	Grupo	n	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	p valor <sup>a</sup>	diferenças significativas <sup>b</sup>
RE (%)	1	8	9,6	0,3	9,6	9,3	10,1	0,0001	Grupo 1 ≠ Grupo 2, 3, 4 Grupo 2 ≠ Grupo 3, 4 Grupo 3 ≠ Grupo 4
	2	8	24,7	0,4	24,8	24,1	25,2		
	3	8	8,7	0,5	8,8	7,9	9,4		
	4	8	16,3	0,5	16,4	15,4	16,9		
Ki-67 (%)	1	8	7,3	0,3	7,2	7	7,8	0,0001	Grupo 1 ≠ Grupo 2, 3, 4 Grupo 2 ≠ Grupo 3, 4 Grupo 3 ≠ Grupo 4
	2	8	15,5	0,3	15,5	14,9	15,9		
	3	8	3,9	0,2	3,9	3,6	4,1		
	4	8	4,3	0,2	4,3	4	4,6		

D.P.:Desvio Padrão

<sup>a</sup> p valor da ANOVA de Kruskal-Wallis

Grupo 1: Placebo, Grupo 2: Estradiol, Grupo 3: *Cimicifuga*, Grupo 4: *Trifolium*

**Tabela 4** Expressão, pelo método imunohistoquímico, dos RE (%) e Ki-67 (%) entre os grupos experimentais após suplementação (Tempo 3) – Serviço de Anatomia Patológica - Santa Casa da Misericórdia de São Paulo

## **5. DISCUSSÃO**

A Terapia Hormonal tem sido considerada de fundamental importância no alívio da sintomatologia climatérica, prevenção da osteoporose e da doença cardiovascular, desde que iniciada precocemente. Entretanto, tem sido associada ao aumento da incidência de neoplasias hormônio-dependentes, bem como outros efeitos colaterais, tais como mastalgia, aumento de peso, fenômenos tromboembólicos e sangramento uterino anormal (WHI-Writing Group, 2002; Gass, 2003; Heart and Estrogen/progestin Replacement Study Research Group 2003; Beral *et al.* 2005; Estrogen and Thromboembolism Risk (ESTHER) Study Group, 2007). Esses dados têm levado alguns pesquisadores a avaliarem outras formas de tratamento, que possam apresentar menor potencial de efeitos indesejáveis.

Atualmente, os fitoestrogênios destacam-se como uma das alternativas mais estudadas. O seu potencial terapêutico para melhora dos sintomas climatéricos foi intensamente avaliado nos últimos anos (Kronenberg, Fugh-Berman, 2002; Coon *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2006; Brett, Keenan, 2007). Entretanto, seus efeitos no endométrio ainda são incertos, particularmente em relação à proliferação celular e possibilidade de evolução para fenômenos hiperplásicos e neoplasia endometrial; estas questões aumentam de importância principalmente ao considerarmos que tais produtos já estão sendo administrados às mulheres, utilizados há muitos anos e por longos períodos.

Neste estudo experimental, procuramos simular em animais as mesmas condições encontradas em humanos, com cuidado de utilizar a mesma dose de princípios ativos disponível em produtos comerciais aprovados pela ANVISA, com a finalidade de observarmos a resposta endometrial a este estímulo.

Sabemos que os fitoestrogênios estão disponíveis em doses constantes, padronizadas e utilizadas por mulheres de pesos diferentes e metabolismos distintos, o que pode alterar o efeito final nos diversos órgãos e tecidos do corpo. Assim sendo, o modelo experimental utilizado de ratas em idade adulta entre 10 e 12 semanas e peso entre 200 e 300 g procurou traçar um paralelo com a mulher com aproximadamente 70 a 80 kg de peso de acordo com diversos trabalhos desenvolvidos com indução de menopausa por castração de ratas *Wistar* (Burdette *et al.*, 2002; Sabatier *et al.*, 2003; Breitman *et al.*, 2003; Bahr *et al.*, 2005; Watkins *et al.*, 2005).

Ao extrapolar a duração da suplementação de substâncias nas ratas ao tempo de vida das mulheres, observamos que cada dia de vida do animal corresponderia a aproximadamente 21 dias em mulheres adultas. Concluímos que a introdução de substâncias no organismo animal pelo período de 28 dias corresponderia a aproximadamente 19 meses de vida. (Burcher *et al.*, 1963; Hollander *et al.*, 1984; Moss, Hollander, 1987; Kang *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2007)

Quando analisamos o peso dos animais antes de iniciarmos a suplementação das diferentes substâncias, observamos que não ocorreu variação significativa entre os grupos no período entre o ato cirúrgico e o início da suplementação das substâncias estudadas. Nesta fase, o Grupo Simulação foi importante para observarmos possíveis fatores ambientais do experimento que pudessem ocorrer em função de más condições de manutenção, má técnica cirúrgica ou pelo fato de alguns animais do grupo não apresentarem condições de saúde adequadas à

pesquisa. Observamos, ainda neste grupo, que não houve aumento significativo de peso, demonstrando normalidade no metabolismo e condições de nutrição em cativeiro adequadas.

Quando avaliamos os pesos dos diferentes grupos após a suplementação, observamos que ocorreu ganho significativo apenas no Grupo Estradiol, não sendo constatada alteração de peso nos outros grupos. Depreendemos, a partir deste fato que, em nosso estudo, o valerato de estradiol induziu um aumento de peso corporal. A literatura demonstra que, utilizando  $17\beta$ -estradiol e não o valerato de estradiol tanto em ratas (Burdette *et al.*, 2003) quanto em mulheres, houve manutenção do peso (Perry *et al.*, 1998; Seumeren, 2000; Strothmann, Schneider, 2003; Genazzani, Gambacciani, 2006; Palácios *et al.*, 2006; Windler *et al.*, 2007).

Em trabalho com valerato de estradiol em ratas, Quirarte *et al.* (2007) observaram perda de peso inicial (nos primeiros quatro dias) com posterior aumento, dados semelhantes aos nossos. Outros trabalhos falam a favor de um aumento no desejo de alimentos adocicados com o uso continuado do valerato de estradiol em ratas (Boswell *et al.*, 2005; Juarez *et al.*, 2006; Quirarte *et al.*, 2007). Este dado pode explicar a diferença de resposta em relação aos outros grupos de experimentação.

No Grupo Cimicifuga, não ocorreu aumento significativo do peso; nossos resultados foram diferentes daqueles descritos em literatura. Burdette *et al.* (2003) observaram aumento de cerca de 20 mg em média para cada animal de seu grupo de estudo durante suplementação por duas semanas. Neste trabalho, foram utilizadas doses variadas de extratos de CR, inclusive muito maiores que a dose

usual que foi objeto de nosso estudo, onde avaliamos o efeito de doses constantes e semelhantes às aquelas administradas às mulheres com sintomatologia climatérica.

No Grupo Trifolium, também não observamos aumento significativo de peso. Burdette *et al.* (2002), utilizando diferentes doses de *Trifolium pratense* (250, 500 e 750 mg/kg ao dia) por três semanas, verificaram que ocorreu diminuição do peso corporal em relação ao Grupo placebo nas doses de 500 e 750 mg/kg ao dia. O grupo que recebeu 17 $\beta$ -estradiol também apresentou diminuição do peso corporal, semelhante às maiores doses. Quando foi utilizada a dose de 250 mg/kg ao dia, não houve alteração do peso, resultado semelhante ao encontrado no grupo placebo. Vale lembrar que as doses que exibiram diminuição do peso foram relativamente maiores que as utilizadas em nosso estudo. Hidalgo *et al.* (2005) também não observaram alteração de peso corporal em mulheres na menopausa que receberam tratamento pelo período de 90 dias na dose de 80 mg por dia. Aparentemente, esta dosagem não induz alterações no peso corporal, embora outros parâmetros também devam ser valorizados ao realizarmos tal suplementação.

Na análise da citologia vaginal nos diferentes grupos, não incluímos o grupo Simulação devido ao fato deste permanecer com seus ciclos hormonais normais. Nos grupos que passaram por suplementação, todos os esfregaços estavam atróficos antes da introdução das substâncias. O esfregaço prévio à suplementação foi importante para confirmar o estado de hipoestrogenismo induzido pela menopausa cirúrgica.

Após o período de reposição, observamos que apenas o grupo que recebeu o valerato de estradiol obteve aumento do índice de Frost com maior número de células superficiais, dado este semelhante à literatura (Wuttke *et al*, 2003; Burdette *et al*, 2003, Malaivijitnond *et al*, 2006). Todos os outros grupos permaneceram com a citologia vaginal atrófica até o final do experimento (Tempo 3). Não encontramos dados na literatura para compararmos este nosso achado, assim, este constitui o primeiro estudo experimental que apresentou resultados do índice de Frost em ratas *Wistar*.

Na suplementação com Cimicifuga, observamos aumento significativo das células intermediárias em relação ao Grupo Trifolium. Esta melhora relativa do trofismo vaginal não foi observada em outros trabalhos e, possivelmente, seja dose-dependente. Burdette *et al*. (2003) evidenciaram pequeno aumento na cornificação de esfregaço vaginal de ratas ooforectomizadas que receberam doses de 400 mg/kg/dia de Cimicifuga não sendo significativamente diferente do Grupo placebo. Raus *et al*. (2006) realizaram trabalho placebo-controlado, com 109 mulheres após a menopausa, que receberam extrato padronizado de CR na dose de 40 mg por dia por 12 semanas. Ao final, observaram pequeno aumento do número de células superficiais.

Quando estudamos a diferenciação celular do epitélio vaginal no Grupo Trifolium obtivemos resultados semelhantes ao Grupo placebo. Burdette *et al*.(2002), em ratas com três semanas de suplementação, relataram aumento da diferenciação para células superficiais, porém foram utilizadas doses do extrato de TP progressivamente maiores, sendo que, na maior dose (750mg/kg por dia), o índice

de maturação aproximou-se muito do alcançado com  $17\beta$ -estradiol. Hidalgo *et al.* (2005) verificaram melhora relativa no índice de cornificação das células epiteliais em 60 mulheres após a menopausa na dose de 80 mg/dia de isoflavonas após três meses de suplementação.

É possível que, em nosso trabalho, se as doses utilizadas de *Trifolium pratense* e *Cimicifuga racemosa* fossem maiores, teríamos observado efeito maior no trofismo vaginal.

Observamos que, na avaliação de cada amostra, o índice de maturação apresentou importante variação, chegando a valores altos em determinados indivíduos; demonstrando que, mesmo com doses padronizadas, pode haver grande variação na resposta individual. Este dado evidencia que o efeito final obtido dependerá de diversos fatores inerentes a usuária da substância, tais como capacidade de absorção, metabolização dos diversos compostos da amostra e relação dose/peso corporal.

Achamos interessante, apesar de não termos dados na literatura, a utilização do índice de Frost. Esse método nos permitiu avaliar melhor a ação de cada suplemento nas diferentes camadas do epitélio vaginal. Assim, pudemos notar uma ação da CR estrogênio-*simile* pelo aumento das células intermediárias com as doses utilizadas. Este efeito genômico pode ser atribuído aos teores de isoflavonas do preparado.

Na análise histológica do endométrio, também excluímos o Grupo Simulação. O Grupo Estradiol apresentou aumento do tamanho e do número de glândulas endometriais, caracterizando endométrio proliferativo, achados estes semelhantes à literatura. De fato, Diel *et al.*(2005) estudando ratas *Wistar* ooforectomizadas que receberam 17 $\beta$ -estradiol por dez dias por via endovenosa nas doses de 1, 4, 10 e 250  $\mu$ g/kg por dia, observaram aumento da espessura endometrial e da proliferação glandular proporcional à dose utilizada e Diel *et al.*(2006), estudando ratas *Wistar* ooforectomizadas, induziram o aumento da espessura endometrial e a intensidade de multiplicação celular utilizando dose de 4 ou 10  $\mu$ g/kg por dia.

O extrato de CR não estimulou proliferação endometrial, permanecendo atrófico. Apenas o trabalho de Seidlova-Wuttke *et al.*(2003) demonstra ausência de estimulação endometrial após 12 semanas de suplementação com derivados de *Cimicifuga racemosa* em ratas. Raus *et al.*(2006), em trabalho com 375 mulheres no climatério que receberam a dose de 40 mg de extrato padronizado de CR por 52 semanas, observaram que não houve crescimento endometrial.

O extrato de TP também não apresentou proliferação celular endometrial significativa. Em nossa revisão bibliográfica não encontramos trabalhos avaliando as glândulas endometriais após a suplementação de *Trifolium pratense* em ratas ooforectomizadas. Apenas o trabalho de Burdette *et al.*(2002) evidenciou aumento do peso uterino, sem citar avaliação endometrial. O estudo de Imhof *et al.* (2006) em 105 mulheres na menopausa mostrou redução da espessura endometrial após suplementação de 80 mg de isoflavonas de Trevo Vermelho por 90 dias. O trabalho de Wolff *et al.* (2006) com suplementação de 80 mg de isoflavonas de TP por seis

meses evidenciou ausência de crescimento endometrial, porém, em seis mulheres ocorreu sangramento vaginal, sendo que duas apresentaram endométrio proliferativo, uma endométrio com hiperplasia simples e três endométrio atrófico. Neste quesito, nosso estudo veio acrescentar conhecimento maior em relação aos animais de experimentação e sua reação ao uso de extratos de TP.

Ao analisarmos a expressão dos receptores estrogênicos no endométrio, levamos em consideração as características teciduais. Sabemos que o mecanismo genômico da atuação das isoflavonas, determinado pela ligação dos receptores nucleares específicos, pode gerar efeitos estrogênicos e antiestrogênicos (Dornstauder *et al.*, 2001). Sendo os receptores estrogênicos de dois tipos: alfa e beta, a concentração dos receptores nos tecidos é o principal determinante da resposta hormonal em dado órgão. Sabemos que os receptores alfa-estrogênicos (RE $\alpha$ ) são encontrados em maior concentração no útero, mama e fígado, enquanto os receptores beta-estrogênicos (RE $\beta$ ) encontram-se em maior número no ovário, próstata, epidídimo, pulmão, hipotálamo e vasos sanguíneos (Alves, Silva, 2002; Kinjo, 2004).

Em nosso estudo, tivemos o cuidado de analisar especificamente a manifestação dos receptores alfa-estrogênicos, que são os encontrados em maior concentração no endométrio. Poucos foram os trabalhos realizados com esta especificação (Weihua *et al.*, 2000; Nikander *et al.*, 2005; Diel *et al.*, 2006, Mylonas *et al.*, 2007).

Ao avaliarmos a expressão dos receptores  $\alpha$ -estrogênicos no endométrio dos animais submetidos à suplementação, observamos que houve expressão significativa dos receptores de estrogênio no Grupo Estradiol quando comparado aos demais.

O Grupo Cimicífuga, quando comparado aos outros grupos, apresentou a menor expressão de receptores estrogênicos alfa, inclusive quando comparado ao Grupo placebo, o que nos leva a hipótese de existirem substâncias inibidoras da estimulação hormonal, semelhantes à ação de um modulador seletivo da expressão de receptores estrogênicos (SERM).

Zireau *et al* (2002) já citaram a ação inibitória da proliferação celular por extratos de CR em cultura de células MCF7, inibição esta proporcional a doses progressivamente maiores do extrato fitoterápico, ocorrida tanto na ausência quanto na presença de estradiol. Seidlova-Wuttke *et al.* (2003) não observaram aumento de peso uterino ou expressão de receptores estrogênicos  $\beta$  (do tecido uterino pulverizado) em útero de ratas suplementadas com extrato padronizado de CR por 3 meses.

Kretzschumar *et al.* (2005) também verificaram pequena atividade antiproliferativa com diminuição do peso uterino, quando comparado ao placebo, após utilização de extratos padronizados de CR, embora não atribuíssem tal fato à presença de substâncias antiproliferativas no preparado fitoterápico. Nisslein e Freudestein (2004) também reportam inibição de proliferação em células de tumor

de endométrio transplantadas em pele de ratos ao utilizarem extratos de CR, com efeitos semelhantes ao tamoxifeno.

Em função dos resultados encontrados (ação inibidora da expressão de receptores  $\alpha$ -estrogênicos), aventamos a possibilidade da *Cimicífuga racemosa*, por apresentar em sua composição baixas concentrações de formononetina e de seu metabólito, a daidzeína, poderiam ser os responsáveis por tal efeito. Devemos considerar ainda os efeitos da *Cimicífuga racemosa* dependente dos outros componentes do extrato, não estimuladores de receptores estrogênicos que poderiam exercer efeitos não genômicos, amplificando a atividade antiestrogênica.

Em relação ao Grupo *Trifolium* notamos também aumento da expressão de receptores  $\alpha$ -estrogênicos, embora com menor intensidade quando comparado com o Grupo Estradiol no Tempo 3 ( $p < 0,0001$ ). Não existem trabalhos em animais ou mulheres que avaliem a expressão de receptores estrogênicos  $\alpha$  no endométrio sob o efeito de *Trifolium pratense*.

A proteína Ki67 está presente no núcleo celular e ocorre durante todas as fases da mitose constituindo marcador de proliferação celular e podendo ainda ser utilizada como marcador do crescimento tumoral, daí nosso interesse em estudá-la (Weihua *et al.*, 2003; Özuyasal *et al.*, 2005; Klaassens *et al.*, 2006)

Resultados esperados foram evidenciados na análise da expressão de Ki67 no Grupo Placebo, que demonstrou baixa expressão, e no Grupo Estradiol com expressão significativa. No Grupo *Cimicífuga*, verificamos uma expressão de Ki67

estatisticamente menor que a encontrada no Grupo placebo; tal fato nos leva a hipótese da ação de substâncias inibidoras da proliferação celular.

Seidlova-Wuttke *et al.*(2003), em estudo com ratas ooforectomizadas já demonstraram que extratos desta planta contêm substâncias ainda não totalmente identificadas com atividade estrogênica no eixo hipotálamo-hipófise sem estimular a proliferação de células miometriais. Raus *et al.*(2006), em trabalho com 400 mulheres no climatério que receberam 40 mg/dia de extrato de *Cimicifuga* durante um ano observaram melhora dos sintomas sem crescimento do endométrio. Estas evidências referem-se apenas a ausência de proliferação celular e não de uma efetiva ação inibidora da multiplicação de células.

Em tecido mamário, esta atividade inibitória já foi evidenciada. Garita-Hernandez *et al.* (2006) observaram efeito antiproliferativo em células de tumor mamário negativas para receptores estrogênicos cujos mecanismos passavam por ocupação de receptores progestogênicos sem, no entanto, exercer efeito estimulatório nestes sítios. Einbond *et al* (2006) demonstraram efeito sinérgico da acteína com doxorubicina e 5-fluoracil na indução de apoptose de células neoplásicas de mama. Em nossa pesquisa, não foram identificados trabalhos que relacionem a atividade da proteína Ki67 a extratos de *Cimicífuga racemosa* no endométrio; portanto, a avaliação aqui discriminada aponta para confirmação de estudos preliminares realizados em culturas de células mamárias.

Ao observarmos o comportamento da proteína Ki67 do Grupo *Trifolium*, verificamos uma baixa expressão dos receptores, mais próxima da obtida com

Cimicífuga que com o placebo. Tal resultado mostra-se, a princípio, paradoxal uma vez que os receptores estrogênicos tiveram uma expressão importante neste grupo, bem maior que o Grupo placebo. Este resultado nos leva à conclusão que o extrato de *Trifolium pratense* contém substâncias que forneceriam estímulo hormonal  $\alpha$ -estrogênico significativo com proliferação celular pouco significativa. Forth *et al* (2000) verificaram padrão semelhante de expressão de Ki67 relativo ao uso de isoflavonas de soja em trabalho com macacas menopausadas. Imhoff *et al.* (2006) já tinham observado diminuição da espessura endometrial, avaliada por ultrassonografia transvaginal, em mulheres que receberam extrato padronizado de TP por 3 meses na dose de 80 mg de isoflavonas por dia. Cheng *et al.* (2007), em trabalho com 60 mulheres na pós-menopausa recebendo isoflavonas de soja ou estradiol, observaram que as isoflavonas não alteraram a intensidade de expressão de Ki67 após o tratamento por três meses, o que foi verificado com o estradiol.

Na literatura, observamos relatos e avaliações que explicam esta menor atividade proliferativa com o uso de isoflavonas. Setchell (1998), ao comentar as ações de fitoestrogênios, particularmente a genisteína, relata este efeito inibidor da proliferação celular pelas isoflavonas em trabalhos com culturas de células de diversas linhagens tumorais e especula sobre possíveis mecanismos celulares não hormonais para este resultado, tais como: inibição da tirosino-quinase, das topoisomerases I e II e a interferência nos mecanismos determinantes da replicação celular.

Outros mecanismos possíveis seriam as ações antioxidantes e antiangiogênicas, bem como inibição de citocinas e fatores de crescimento. Kim *et*

al (1998) avaliam que os efeitos das isoflavonas, particularmente genisteína, vão muito além da atividade genômica, evidenciando a atividade antioxidante, a regulação da transcrição genética e da fosforilação da tirosina. Zhou e Lee (1998) observaram que a genisteína é um potente inibidor das proteínas GRP78 e HSP70 em cultura de células submetidas à azetidina, evidenciando assim uma atividade antiproliferativa e antitumoral; esta atividade ocorreria regulando a transcrição genética durante a duplicação celular por inibição da fosforilação induzida pela tirosino-quinase.

Nossa observação confirma a hipótese de mecanismos não hormonais interferirem com a replicação celular quando utilizamos um fitoestrogênio baseado principalmente no teor de isoflavonas, levando a menor índice de proliferação celular.

Nossos resultados podem ser questionados em função da pequena amostragem para cada grupo de observação. Trabalhos em larga escala, principalmente focando as ações no epitélio vaginal e endometrial em mulheres, devem ser estimulados para confirmação de nossas observações.

Outro dado a ser avaliado seria a utilização de doses maiores que não foram utilizadas neste estudo, principalmente de isoflavonas do *Trifolium pratense*, que poderiam talvez apresentar resultado mais próximo ao obtido com a estimulação de receptores estrogênicos pelo valerato de estradiol, sem repercutir significativamente na proliferação celular endometrial.

Avaliando as informações fornecidas por nosso estudo com animais, podemos levantar outros quesitos a serem analisados e, com as devidas adaptações, servirem como orientação para futuros ensaios em mulheres. Considerando as variações de peso, tivemos confirmação de estudos anteriores, que falam da ausência de alteração com os fitoestrogênios. Em relação à citologia vaginal, um dado significativo foi uma melhora relativa na camada intermediária com o uso de *Cimicifuga*, não observada com *Trifolium* que, teoricamente, deveria ter um efeito mais expressivo.

Quanto ao endométrio, a histologia não mostrou resultados divergentes da literatura, mas a avaliação dos receptores  $\alpha$ -estrogênicos e do marcador de proliferação celular Ki67 mostraram resultados expressivos que sugerem segurança para utilização destes compostos no tratamento das manifestações do climatério. Estas observações aumentam de magnitude se extrapolarmos o tempo relativo de vida das ratas para a mulher.

Analisando as substâncias fitoterápicas e seus constituintes, observamos que os resultados não proliferativos em endométrio foram obtidos de modo distinto já que as isoflavonas do *Trifolium pratense* utilizam preferencialmente a via genômica de ação enquanto os alcalóides triterpênicos, os quais são os principais constituintes da *Cimicifuga racemosa*, exerceriam preferencialmente atividade não genômica.

O uso associado do TP e CR como terapêutica para a sintomatologia do climatério, pode ser uma possibilidade; em tal situação, teríamos uma proteção endometrial utilizando o sinergismo entre estes fitomedicamentos além da atividade

do *Trifolium pratense* com benefícios nos diversos tecidos (endotélio vascular, ossos, pele e pulmão) e a atividade dos derivados de *Cimicífuga racemosa* no hipotálamo com diminuição dos sintomas vasomotores

O avanço da biologia molecular e as novas pesquisas laboratoriais nos darão substratos para maior segurança na utilização de fitoestrogênios em mulheres sintomáticas no climatério. Nesse sentido, observamos aumento exponencial no número de trabalhos científicos publicados em revistas nacionais e internacionais, demonstrando de maneira cabal a relevância e importância de nosso estudo.

## **6.CONCLUSÃO**

O estudo citológico do esfregaço vaginal de *Rattus Norvegicus Albinus* (WISTAR) ooforectomizadas demonstrou que:

- Houve predomínio de células superficiais somente no grupo de ratas tratadas com valerato de estradiol
- O esfregaço vaginal permaneceu atrófico nos grupos *Trifolium pratense* e *Cimicífuga racemosa*
- O Grupo que recebeu *Cimicífuga racemosa* apresentou aumento de células intermediárias quando comparado aos grupos Placebo e *Trifolium pratense*.

No estudo do endométrio observamos que:

- O grupo tratado com valerato de estradiol apresentou endométrio proliferativo
- Os demais grupos apresentaram atrofia endometrial

Em relação a expressão dos receptores de estrogênio :

- Todos os Grupos apresentaram expressão de receptores estrogênicos:
- Os Grupos estradiol e *Trifolium pratense* apresentaram expressão significativamente maior quando comparados ao placebo;
- O Grupo *Cimicífuga racemosa* apresentou expressão significativamente menor que o placebo

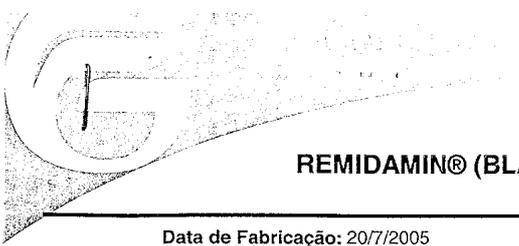
Em relação a dos expressão da proteína Ki67:

- Todos os Grupos apresentaram expressão da proteína Ki67:
- Os Grupos *Trifolium pratense* e *Cimicífuga racemosa* apresentaram menor expressão em relação ao placebo enquanto o valerato de estradiol apresentou expressão significativamente maior.

- A expressão da proteína Ki67 no Grupo *Trifolium pratense* foi significativamente maior que no Grupo *Cimicífuga racemosa*



ANEXO 1: EXTRATO PADRONIZADO DE *CIMICIFUGA RACEMOSA*

			
		<b>569</b> Serq.13/14	
<b>REMIDAMIN® (BLACK COHOSH-L)</b>			
Data de Fabricação: 20/7/2005 Data de Validade: 19/7/2008 Lote Galena (CIQ): 0601020704		País de Origem: CHINA Lote de Fabricação: 050720 Nota Fiscal: 0725569	
<i>Produto encontra-se nos seguintes volumes</i> <u>2</u>			
Nome Botânico: Cimicifuga racemosa (L.) Classe Terapêutica: Tratamento Da Menopausa			
ARMAZENAMENTO: Armaz.Temp. Ambiente, em recipiente fechado protegido da luz e umidade.			
Análises/Componentes	Especificações	Resultados das análises	
<b>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b>			
• Descrição (0)	Pó fino marrom amarelado	Pó fino cristalino amarelado	
• Odor (0)	Característico	Característico	
• Doseamento (27-deoxiacteína, por UV) * (0)	Não menos que 2,5%	2,7%	
• Perda por dessecação (1g, 105°C, 3Hrs) (0)	Não mais que 8,0%	4,5%	
• Granulometria (0)	min. 90% passa por 60 mesh	91% passa	
• Metais pesados (0)	Não mais que 20ppm	< 20ppm	
• Cinzas totais (0)	Não mais que 10,0%	6,0%	
• Densidade aparente (1)	Informativo	0,5g/ml	
<b>MICROBIOLÓGICO</b>			
• Fungos e leveduras (1)	Não mais que 100ufc/g	< 100ufc/g	
• Salmonella spp (0)	Ausente	Ausente	
• Escherichia coli (0)	Ausente	Ausente	
• S.aureus (0)	Ausente	Ausente	
• P. aeruginosa (0)	Ausente	Ausente	
• Bactérias aeróbicas (0)	Não mais que 1000ufc/g	< 1000ufc/g	
* - Análises em acordo com o certificado de análise do fornecedor. As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena. Referências: (0) Conforme literatura do fornecedor.; (1) Conforme metodologia interna Galena.; (2) Farmacopéia Britânica, Edição 2002.; (3) Farmacopéia Americana, 28ª Edição..			
Resultado: ( X ) <b>Aprovado</b>		Data da Análise: 13/1/2006	Nr.Ctrl.: 008186-008002G0011/4111



**Roberto T. Yoshida**  
 Farmacêutico Responsável  
 CRF-SP: 18.441

(10)

## ANEXO 2: EXTRATO PADRONIZADO DE TRIFOLIUM PRATENSE

Análises/Componentes		Especificações	Resultados das análises
<b>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b>			
• Descrição (4)	Pó preto a marrom esverdeado ou amarelado, higroscópico.	Pó marrom esverdeado higroscópico	
• Odor (4)	Característico	Característico	
• Doseamento (Isoflavona por HPLC) * (4)	Não menos que 8,0%	9,7%	
• Perda por dessecação (4)	Não mais que 5,0%	3,0%	
• Granulometria (4)	95% passa por 80 Mesh	Conforme	
• Metais pesados * (4)	Não mais que 20ppm	Menor que 20 ppm	
• Cinzas sulfatadas (4)	Não mais que 5,0%	1,6%	
• Densidade aparente (1)	Informativo	0,4g/ml	
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>			
• Identificação * (4)	Positivo	Conforme	
<b>MICROBIOLÓGICO</b>			
• Salmonella spp * (4)	Ausente	Ausente	
• Escherichia coli * (4)	Ausente	Ausente	
• S. aureus * (4)	Ausente	Ausente	
• P. aeruginosa * (4)	Ausente	Ausente	
• Bactérias aeróbicas * (4)	Não mais que 1000ufc/g	Menor que 1000ufc/g	
• Fungos e Leveduras * (4)	Não mais que 100ufc/g	Menor que 100ufc/g	

\* Análises em acordo com o certificado de análise do fornecedor.  
As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.  
Referências: (0) Farmacopéia Britânica, Edição 2002.; (1) Conforme metodologia interna Galena.; (2) BP2002/US:24.; (3) Farmacopéia Americana, 28ª Edição.; (4) Conforme literatura do fornecedor.

Produto com aspecto amarelado devido ao processo de produção do fabricante.

Resultado: ( X ) **Aprovado** Data da Análise: 25/05/2005 Nr. Ctrl.: 003423-001293G0006/4278

  
**Roberto T. Yoshida**  
 Farmacêutico Responsável  
 CRF-SP: 18.441

  
 Este produto atende aos requisitos da BPDF e apresenta segurança e garantia de sua qualidade

Validade de validade: 2000  


### ANEXO 3 : PESO DE TODOS OS ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

RATA	PESO NA OOFORECTOMIA	PESO NO INICIO DA REPOSIÇÃO	PESO AO FINAL DA REPOSIÇÃO
rata controle 1	236	230	239
rata controle 2	247	241	228
rata controle 3	228	247	212
rata controle 4	218	224	230
rata controle 5	261	245	226
rata controle 6	232	217	225
rata controle 7	245	231	208
rata placebo 1	218	226	218
rata placebo 2	265	297	259
rata placebo 3	252	289	273
rata placebo 4	215	223	228
rata placebo 5	236	267	258
rata placebo 6	247	271	285
rata placebo 7	238	252	264
rata placebo 8	260	263	251
rata placebo 9	228	223	235
rata estradiol 1	270	275	299
rata estradiol 2	279	288	310
rata estradiol 3	237	230	259
rata estradiol 4	241	237	265
rata estradiol 5	254	258	271
rata estradiol 6	266	259	279
rata estradiol 7	268	261	295
rata estradiol 8	256	260	272
rata isoflavona 1	255	232	262
rata isoflavona 2	270	292	284
rata isoflavona 3	265	299	283
rata isoflavona 4	267	297	275
rata isoflavona 5	244	252	230
rata isoflavona 6	248	258	246
rata isoflavona 7	300	330	320
rata isoflavona 8	298	312	293
rata cimicifuga 1	264	244	280
rata cimicifuga 2	269	276	247
rata cimicifuga 3	234	244	219
rata cimicifuga 4	220	230	300
rata cimicifuga 5	254	285	305
rata cimicifuga 6	274	224	237
rata cimicifuga 7	235	253	278
rata cimicifuga 8	249	210	238
rata trifolium 1	261	232	197
rata trifolium 2	208	213	237

<b>rata trifolium 3</b>	251	266	247
<b>rata trifolium 4</b>	230	232	216
<b>rata trifolium 5</b>	253	249	231
<b>rata trifolium 6</b>	257	256	230
<b>rata trifolium 7</b>	246	241	234
<b>rata trifolium 8</b>	234	285	297

## ANEXO 4: APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ

CENTRO DE CIRURGIA EXPERIMENTAL  
DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
DA FACULDADE DE MEDICINA

### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de Animais de Laboratório em Pesquisa, Ensino e Extensão (CEPAL), o projeto do mestrando DÉCIO LUIS ALVES, intitulado: "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO *TRIFOLIUM PRATENSE* E DA *CIMICÍFUGA RACEMOSA* NO ENDOMÉTRICO, TECIDO MAMÁRIO, NA MUCOSA VAGINAL E NA PELE DE *RATTUS NORVEGICUS* OOFORRECTOMIZADOS**", sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Rolim Rosa Lima e co-orientação do Prof. Dr. Alberto Schanaider, em 10 de agosto de 2005.

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2005.

Prof. Alberto Schanaider  
Departamento de Cirurgia  
Insp. pelo Lab. de Cirurgia Experimental  
Faculdade de Medicina - UFRJ

RECEBI em 13/9/05 - Décio Luis Alves

## ANEXO 5: ANÁLISE DAS TABELAS DE PESOS

### COMPARAÇÃO DE PESO NO INÍCIO E AO FINAL - GRUPO SIMULAÇÃO

Hipótese: não houve ganho de peso  
 Teste: t de student para dados pareados  
 Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>início</i>	<i>Final</i>
Média	233,5714286	224,000
Variância	125,2857143	113,6666667
Observações	7	7
	-	
Correlação de Pearson	0,272342878	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	6	CONCLUSÃO: Não houve ganho de peso, as médias são iguais, $p=0,098284$
Stat t	1,452522966	
P(T<=t) uni-caudal	0,098284238	
t crítico uni-caudal	1,943180905	
P(T<=t) bi-caudal	0,196568476	
t crítico bi-caudal	2,446913641	

### COMPARAÇÃO DE PESO NO INÍCIO E AO FINAL – GRUPO PLACEBO

#### COMPARAÇÃO PESO NO INÍCIO E AO FINAL ratos placebos

Hipótese: não houve ganho de peso  
 Teste: t de student para dados pareados  
 Teste-t: duas amostras em par para médias

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>início</i>	<i>Final</i>
Média	261	254,5
Variância	710	491,7142857
Observações	8	8
Correlação de Pearson	0,773205317	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	CONCLUSÃO: Não houve ganho de peso, as médias são iguais, $p=0,1572794$
Stat t	1,083333333	
P(T<=t) uni-caudal	0,157279422	
t crítico uni-caudal	1,894577508	
P(T<=t) bi-caudal	0,314558843	
t crítico bi-caudal	2,36462256	

## COMPARAÇÃO DE PESO NO INÍCIO E AO FINAL – GRUPO ESTRADIOL

Hipótese: não houve ganho de peso  
 Teste: t de student para dados pareados  
 Teste-t: duas amostras em par para médias

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>início</i>	<i>Final</i>
Média	258,5	281,25
Variância	346,5714286	326,5
Observações	8	8
Correlação de Pearson	0,912641902	
Hipótese da diferença de média	0	CONCLUSÃO : HOUVE GANHO DE PESO, A MÉDIA NO FINAL É SIGNIFICATIVAMENTE MAIOR DO QUE NO INÍCIO
gl	7	P=0,000034
Stat t	-8,372162661	
P(T<=t) uni-caudal	0,0000340520064	
t crítico uni-caudal	1,894577508	
P(T<=t) bi-caudal	6,8104E-05	
t crítico bi-caudal	2,36462256	

## COMPARAÇÃO DE PESO NO INÍCIO E AO FINAL – GRUPO CIMICIFUGA

Hipótese: não houve ganho de peso  
 Teste: t de student para dados pareados  
 Teste-t: duas amostras em par para médias

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>início</i>	<i>final</i>
Média	245,75	263
Variância	644,7857143	1020
Observações	8	8
Correlação de Pearson	0,387011819	
Hipótese da diferença de média	0	CONCLUSÃO: Não houve ganho de peso, as médias são iguais, p=0,086766
gl	7	
Stat t	1,515059741	
P(T<=t) uni-caudal	0,08676624	
t crítico uni-caudal	1,894577508	
P(T<=t) bi-caudal	0,17353248	
t crítico bi-caudal	2,36462256	

## COMPARAÇÃO DE PESO NO INÍCIO E AO FINAL - GRUPO TRIFOLIUM

Hipótese: não houve ganho de peso

Teste: t de student para dados pareados

Teste-t: duas amostras em par para médias

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>INÍCIO</i>	<i>FINAL</i>
Média	246,75	236,125
Variância	504,5	832,6964286
Observações	8	8
Correlação de Pearson	0,733133241	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	CONCLUSÃO: Não houve ganho de peso, as médias são iguais, p=0,085183814
Stat t	1,527948252	
P(T<=t) uni-caudal	0,085183814	
t crítico uni-caudal	1,894577508	
P(T<=t) bi-caudal	0,170367629	
t crítico bi-caudal	2,36462256	

## ANEXO 6: TABELAS DE ANÁLISE DE RECEPTORES ESTROGÊNICOS

Análise de variância (ANOVA) dos testes para RE

Anova: fator único		Todos os grupos				
RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Cimicifuga	8	69,5	<b>8,69</b>	0,266964		
Placebo	8	76,8	<b>9,60</b>	0,088571		
Simulação	7	91,4	<b>13,06</b>	0,079524		
Trifolium	8	130,4	<b>16,30</b>	0,268571		
Estradiol	8	197,4	<b>24,68</b>	0,147857		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1331,099	4	332,7748	1923,916	0,00	2,649898
Dentro dos grupos	5,880893	34	0,172967			
Total	1336,98	38				
Conclusão: Há diferença significativa entre as médias						

Teste de Tukey para análise comparativa entre as médias de manifestação dos receptores estrogênicos, evidenciando diferenças significativas entre si.

### TESTE DE TUKEY

MÉDIAS	8,69	9,60	13,06	16,30	24,68
8,69	0				
9,60	0,913	0			
13,06	4,370	3,457	0		
16,30	7,613	6,700	3,243	0	
24,68	15,988	15,075	11,618	8,375	0

q.m.s= 0,536698

MÉDIAS	8,69	9,60	13,06	16,30	24,68
8,69	0				
9,60	DIF	0			
13,06	DIF	DIF	0		
16,30	DIF	DIF	DIF	0	
24,68	DIF	DIF	DIF	DIF	0

CONCLUSÃO: TODAS AS MÉDIAS SÃO DIFERENTES ENTRE SI

## ANEXO 7: TABELAS DE ANÁLISE DE PROTEÍNA KI67

Teste de Tukey para análise comparativa entre as médias de manifestação da proteína Ki67 , evidenciando diferenças significativas entre si.

		TESTE DE TUKEY			
		Placebo	Cimicifuga	Trifolium	Estradiol
médias		7,25	3,9	4,25	15,4625
Placebo	<b>7,250</b>	0			
Cimicifuga	<b>3,900</b>	3,350	0		
Trifolium	<b>4,250</b>	3,000	0,350	0	
Estradiol	<b>15,463</b>	8,213	11,563	11,213	0

		7,25	3,9	4,25	15,4625
Placebo	<b>7,250</b>	0			
Cimicifuga	<b>3,900</b>	DIF	0		
Trifolium	<b>4,250</b>	DIF	DIF	0	
Estradiol	<b>15,463</b>	DIF	DIF	DIF	0

CONCLUSÃO: todas as médias são diferentes entre si

Análise de variância (ANOVA) dos testes para Ki67

Anova: fator único		todas as fontes					
RESUMO							
	Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
	Placebo	8	58	7,250	0,0685714		
	Controle	7	77,5	11,071	0,062381		
	Cimicifuga	8	31,2	3,900	0,0228571		
	Trifolium	8	34	4,250	0,0485714		
	Estradiol	8	123,7	15,463	0,1055357		
ANOVA							
	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
	Entre grupos	759,0844	4	189,7711	3082,7077	0,000000	2,6499
	Dentro dos grupos	2,093036	34	0,06155987			
	Total	761,1774	38				
CONCLUSÃO:, as médias são estatisticamente diferentes.							

## **8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdalla GK, Silveira MR, Lazo JE. Guia rápido de utilização do software de morfometria ImageJ. 2005. Available from: [http://www.fmtm.br/instpub/fmtm/discbiologiacelular/Guia rápido de utilização do Image J.pdf](http://www.fmtm.br/instpub/fmtm/discbiologiacelular/Guia_rápido_de_utilização_do_Image_J.pdf)

Alves DL, Silva CR. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002. pág 35

Bahr JM, Nakai M, Rivera A, Walsh J, Evans GL, Lotinun S, Turner RT, Black M, Jeffery EH. Dietary soy protein and isoflavones: minimal beneficial effects on bone and no effect on the reproductive tract of sexually mature ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause*. 2005. 12(2):165-73.

Beral V, Bull D, Reeves G Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study *Lancet* 2005;365:1543-1551.

Boswell KJ, Reid ML, Fitch JV, Bennett SM, Narciso SP, Hubbell CL, Reid LD. Estradiol valerate and intake of sweetened water. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2005. January 80(1):1-7.

Brandão DC. A História da Fitoterapia. In: Lima SMRR. Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica, 1ª ed. São Paulo; Atheneu: 2006, 1-9.

Breitman P, Fonseca D, Cheung AM, Ward WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. 2003 *Bone* 33:597-605.

Brett MK, Keenan NL. Complementary and alternative medicine use among midlife women for reasons including menopause in the United States: 2002. *Menopause*. 2007. 14(2):300-07.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17:489-503.

Burcher NLR, Swaffield MS, Dltroia JHF. The Influence of Age upon the Incorporation of Thymidine-2-C14 into the DNA of Regenerating Rat Liver. *Cancer Research*. 1963.4:509-12.

Burdette JE, Liu J, Lantvit D, Lim E, Booth N, Bhat KPL, Hedayat S, Van Breemen RB, Constantinou AI, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Bolton JL. *Trifolium pratense* (Red Clover) Exhibits Estrogenic Effects In Vivo in Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. *J. Nutr.* 2002. 132:27-30.

Burdette JE, Liu J, Chen S, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto JM, Mesecar A, Van Breemen RB, Farnsworth NR, Bolton JL. Black Cohosh Acts as a Mixed Competitive Ligand and Partial Agonist of the Serotonin Receptor. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51:5661-70.

Campbell SJ, Carare-Nnadi RO, Losey PH, Anthony DC. Loss of the atypical inflammatory response in juvenile and aged rats. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2007.33:108–120.

Carvalho G. Estudo das distintas fases do ciclo sexual normal por meio do conteúdo celular encontrado na cavidade vaginal. Estudo de outros tipos de esfregaços, diferentes dos observados no ciclo menstrual normal e relacionados ou não com atividade hormonal. *Citologia do trato genital feminino*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 1993, pag. 149-195.

Carvalho S. Estudo imunoistoquímico e morfométrico da expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e Ki67 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa. Tese (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2006.

Carvalho T, Vala H, Pinto C, Pinho M, Peleteiro MC. Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Vet Pathol.* 2005 Jan;42(1):66-73.

Cheng G, Wilczek B, Warner M, Gustafsson J, Landgren BM. Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause.* 2007.14(3):468-73.

Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertility and Sterility* 2004. Feb; 81(2).

Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol.* 1988 Apr;15(2 Suppl 1):20-5.

Clause BT. The Wistar Institute Archives: rats (not mice) and history. *Mendel Newsl.* 1998 Feb;(7):2-7.

Clifton-Bligh PB, Baber RJ, Fulcher GR, Nery ML, Moreton T. The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. *Menopause.* 2001. Jul-Aug;8(4):259-65.

Cohen, M.H. - Complementary and integrative medical therapies, the FDA, and the NIH: definitions and regulation. *Dermatol Ther.* 2003; 16(2): 77-84 .

Coon JT, Pittler MH, Ernst E. *Trifolium pratense* isoflavones in the treatment of menopausal hot flashes: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine.* 2006; 14(2007): 1531-59.

Cramer DW, Hornstein MD, McShane P, Powers RD, Lescault PJ, Vitonis AF, et al. Human progesterone receptor polymorphisms and implantation failure during in vitro Fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1085-92.

Diel P, Laudenschlager U, Friedel A, Voss A, Roussel J. Pulsed estradiol exposure has a limited ability to induce uterine proliferation in ovariectomized female Wistar rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2005;230:7–15.

Diel P, Hertrampf T, Seibel J, Laudenschlager U, Kolba S, Vollmer G. Combinatorial effects of the phytoestrogen genistein and of estradiol in uterus and liver of female Wistar rats. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2006; 102:60–70.

Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001 Jul;78(1):67-75.

Einbond LS, Shimizu M, Nuntanakorn P, Seter C, Cheng R, Jiang B, Kronenberg F, Kennelly EJ, Weinstein IB. Actein and a fraction of black cohosh potentiate antiproliferative effects of chemotherapy agents on human breast cancer cells. *Planta Med*. 2006 Oct;72(13):1200-6.

Estrogen and Thromboembolism Risk (ESTHER) Study Group. Hormone Therapy and Venous Thromboembolism Among Postmenopausal Women. *Circulation*. 2007;115:840-45.

Faria CA. Efeitos do tamoxifeno sobre as citologias vaginal e urinária e a dopplervelocimetria dos vasos peri-uretrais de mulheres na pós-menopausa Tese (Mestrado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.

Forth D, Cline JM, Römer T. Effect of isoflavones on mammary gland and endometrium of postmenopausal macaques (*Macaca fascicularis*). *Zentralbl Gynakol.* 2000;122(2):96-102.

Frost, J. K.: *Concepts Basic to General Cytopathology.* ed. 2. Baltimore, Johns Hopkins University School of Medicine, 1961

Garita-Hernandez M, Calzado MA, Caballero FJ, Macho A, Muñoz E, Meier B, Brattström A, Fiebich BL, Appel K. The growth inhibitory activity of the *Cimicifuga racemosa* extract Ze 450 is mediated through estrogen and progesterone receptor-independent pathways. *Planta Med.* 2006 Mar;72(4):317-23

Gass M. Impact of WHI conclusions and ACOG guidelines on clinical practice. *Int J Fertil Womens Med.* 2003 MayJun;48(3):106-10.

Genazzani AR, Gambacciani M. Effect of climacteric transition and hormone replacement therapy on body weight and body fat distribution. *Gynecological Endocrinology*, 2006 March; 22(3):145 – 150.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31:13-20.

Hale GE, Hughes CL, Robboy SJ, Agarwal SK, Bievre M. A double-blind randomized study on the effects of red clover isoflavones on the endometrium. *Menopause.* 2001 Sep-Oct;8(5):338-46.

Heart and Estrogen/progestin Replacement Study Research Group. Risk Factors and Secondary Prevention in Women with Heart Disease: The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *AnnInternMed.* 2003;138:81-89

Hidalgo LA, Chedraui PA, Morocho N, Ross S, San Miguel G. The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Gynecol Endocrinol*. 2005 Nov;21(5):257-64.

Hollander CF, Solleveld HA, Zurcher C, Nootboom AL, VanZweiten MJ. Biological and clinical consequences of longitudinal studies in rodents: their possibilities and limitations. *Mech Ageing Dev*. 1984;28:249-260.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1981 Nov;29(11):1349-53.

Imhof M, Gocan A, Reithmayr F, Lipovac M, Schimitzek C, Chedraui P, Huber J. Effects of a red clover extract (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women. *Maturitas* 2006 Aug; 55(1):76-81.

Jarry H, Metten M, Spengler B, Christoffel V, Wuttke W. In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas*. 2003 Mar; 14:44 Suppl 1:S31-8.

Juárez J, Camargo G, Gómez-Pinedo U. Effects of estradiol valerate on voluntary alcohol consumption,  $\beta$ -endorphin content and neuronal population in hypothalamic arcuate nucleus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2006 September;85(1):132-139.

Kaari C., Baracat E.C. Análise Crítica das Evidências Terapêuticas dos Efeitos da *Cimicifuga racemosa*. In: *Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica*. São Paulo: Atheneu; 2006, pp 185-91

Kang KB, Vand Der Zypp A, Iannazzo L, Majewski H. Age-related changes in monocyte and platelet cyclooxygenase expression in healthy male humans and rats. *Transl Res*. 2006 Dec;148(6):289-94.

Kim H, Peterson TG, Barnes S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor signaling pathways. *Am J Clin Nutr* 1998;68(suppl):1418-25.

Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, Hirose T, Aomori T, Nagao T, Okabe H, Nohara T, Masamune Y. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull*. 2004 Feb;27(2):185-8.

Klaassens AH, van Wijk FH, Hanifi-Moghaddam P, Sijmons B, Ewing PC, Ten Kate-Booij MJ, Kooi GS, Kloosterboer HJ, Blok LJ, Burger CW. Histological and immunohistochemical evaluation of postmenopausal endometrium after 3 weeks of treatment with tibolone, estrogen only, or estrogen plus progestagen. *Fertil Steril*. 2006 Aug;86(2):352-61.

Kretzschmar G, Nisslein T, Zierau O, Vollmer G. No estrogen-like effects of an isopropanolic extract of *Rhizoma Cimicifugae racemosae* on uterus and vena cava of rats after 17 day treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005 Nov;97(3):271-7.

Kronenberg F, Fugh-Berman. A Complementary and Alternative Medicine for Menopausal Symptoms: A Review of Randomized, Controlled Trials. *Ann Intern Med*. 2002;137:805-813.

Kupper H, Typlt H, Grimmecke HD, Fiebig H. Slide test for immunofluorescent microscopy and immunoenzyme detection of cell-membrane antigens. *Allerg Immunol (Leipz)*. 1983;29(4):223-8.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5925-30.

Kurman RJ, Norris HJ. Endometrial hyperplasia and metaplasia. In: Kurman RJ. Blaustein's pathology of the female genital tract. 3<sup>a</sup> ed. New York: Ed. Springer-Verlag; 1987. p.322-37.

Lehmann-Willenbrock E, Riedel HH. Clinical and endocrinologic studies of the treatment of ovarian insufficiency manifestations following hysterectomy with intact adnexa. *Zentralbl Gynakol.*1988;110(10):611-8.

Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M. Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2004 Sep;24(17):7681-94.

Lima S.M.R.R., Alves D.L. Análise Crítica das Evidências Terapêuticas dos Efeitos do *Trifolium pratense*. In: Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica. São Paulo: Atheneu; 2006, pp 165-172

Liske E, Hänggi W, Henneicke-von Zepelin HH, Boblitz N, Wüstenberg P, Rahlfs VW. Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifugae racemosae rhizoma*): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *J Womens Health Gend Based Med.* 2002 Mar;11(2):163-74.

Low Dog T, Powell KL, Weisman SM. Critical evaluation of the safety of *Cimicifuga racemosa* in menopause symptom relief. *Menopause.* 2003 Jul-Aug;10(4):299-313.

Lustosa AB, Girão MJBC, Sartori MGF, Baracat EC, Lima GR. Citologia Hormonal do Trato Urinário Baixo e da Vagina de Mulheres na Pós-menopausa, antes e durante Estrogenioterapia Oral e Transdérmica. *RBGO.*2002;24(9):573-77.

Mahady GB, Fabricant D, Chadwick LR, Dietz B. Black cohosh: an alternative therapy for menopause? *Nutr Clin Care.* 2002 Nov-Dec;5(6):283-9.

Mahady GB. Black cohosh (*Actaea/Cimicifuga racemosa*): review of the clinical data for safety and efficacy in menopausal symptoms. *Treat Endocrinol.* 2005;4(3):177-84.

Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N, Cherdshewasart W. Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen rich herb. *J Ethnopharmacol.* 2006 Oct; 107(3):354-60.

Mandarim-de-Lacerda CA. Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria e estereologia. Rio de Janeiro, CEBIO, 1991, 98p.

McKenna DJ, Jones K, Humphrey S, Hughes K. Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med.* 2001 May-Jun;7(3):93-100.

Mos J, Hollander CF. Analysis of survival data on aging rat cohorts: pitfalls and some practical considerations. *Mech Ageing Dev.* 1987;38:89-105.

Montes GS, Nicoletis MAL, Brentani-Samaia HP, Furuie SS. Collagen fibril diameters in arteries of mice -A comparison of manual and computer-aided morphometric analyses. *Acta Anatomica* ,1989 ;135: 57-61.

Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Kunze S, Dian D, Friedl C, Kupka MS, Friese K. Steroid receptors ERalpha, ERbeta, PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium. *Histol Histopathol.* 2007 Feb;22(2):169-76.

Newton KM, Reed SD, LaCroix AZ, Grothaus LC, Ehrlich K, Guiltinan J. Treatment of Vasomotor Symptoms of Menopause with Black Cohosh, Multibotanicals, Soy, Hormone Therapy ,or Placebo: A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 2006;145:869-879.

Nikander E, Rutanen EM, Nieminen P, Wahlström T, Ylikorkala O, Tiitinen A. Lack of effect of isoflavonoids on the vagina and endometrium in postmenopausal women. *Fertil Steril.* 2005 Jan;83(1):137-42.

Nisslein T, Freudenstein J. Concomitant administration of an isopropanolic extract of black cohosh and tamoxifen in the in vivo tumor model of implanted RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma cells. *Toxicol Lett.* 2004 May 2;150(3):271-5.

Oerter Klein, K.; Janfaza, M.; Wong, J.A.; Chang, R.J. – Estrogen bioactivity in fo-ti and other herbs used for their estrogen-like effects as determined by a combinant cell bioassay. *J Clin. Endocrinol. Metabol.*, 2003. 88(9):4075-6.

Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasma*. 2005;52(5):420-4.

Özuyasal S., Öztürk H., Bilgin T., Filiz G. Expression of cyclin D1 in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium and its correlation with Ki-67 and clinopathological variables. *Arch Gynecol Obstet*, 2005; 271:123-126.

Palacios S, Foidart JF, Genazzani AR. Advances in hormone replacement therapy with drospirenone, a unique progestogen with aldosterone receptor agonism. *Maturitas* 2006; 55:297–307.

Perry AC, Allison M, Applegate EB, Jackson ML, Miller PC. The relationship between fat distribution and coronary risk factors in sedentary postmenopausal women on and off hormone replacement therapy. *Obes Res*. 1998 Jan;6(1):40-6.

Piazza, MJ. Intensidade dos receptores de estrogênio em fragmentos da mucosa vaginal. *Reprod Clim*. 1996;11(3):143-50.

Quirarte GL, Reid LD, De la Teja ISL, Reid ML, Sánchez MA, Díaz-Trujillo A, Aguilar-Vazquez A, Prado-Alcalá RA. Estradiol valerate and alcohol intake: dose-response assessments. *BMC Pharmacol*. 2007; 7: 3

Radowicki S, Skórzewska K, Rudnicka E, Szlendak-Sauer K, Wierzba W. Effectiveness and safety of the treatment of menopausal syndrome with *Cimicifuga racemosa* dry extract. *Ginekol Pol*. 2006 Sep;77(9):678-83.

Raus K, Brucker C, Gorkow C, Wuttke W. First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (*Actaea* or *Cimicifuga racemosa* extract) CR BNO 1055. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society* 2006;13(4):678-691.

Rodrigues DC, Silva IF. Colpocitologia funcional. In: Medina J, Salvatore CA, Bastos AC, editores. Propedêutica Ginecológica. 3ª ed. São Paulo: Manole; 1977. p.159–74.

Sabatier CV, Coxam V, De Chelotte P, Picherit C, Horcajada MN, Davicco MJ, Lebecque P, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Phytoestrogen-Rich Diets Modulate Expression of Brca1 and Brca 2 Tumor Suppressor Genes in Mammary Glands of Female Wistar Rats. *Cancer Research*. 2003 October; 63:667-6612.

*Sakai Y, Zhong R, Garcia B, Zhu L, Wall WJ. Assessment of the longevity of the liver using a rat transplant model. Hepatology 1997 Feb;25(2):421-5.*

Saber S., Salehian P. P53 and Ki67 biomarkers as prognostic factors of non small cell lung carcinoma. *Acta Medica Iranica*. 2005. 43(2): 127-130

Sawhney N, Hall PA. Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol*. 1992 Oct;168(2):161-2.

Schmitt FC, Andrade LM, Lucca LA. Detection of estrogen receptor in formallin-fixed and paraffin-embedded breast carcinoma: correlation with histological patterns. *Rev Paul Med*.1992;110: 158-61.

Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diagn Cytopathol*. 1995; 13:347-51.

Seidlova´-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W. Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta *European Journal of Endocrinology* .2003;149:351–362.

Setchell KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 1998;68(suppl):1333S-46S.

Seumeren I. Weight gain and hormone replacement therapy: are women's fears justified? *Maturitas* 2000;34:S3 - S58.

Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, van Dalen CH, Geurts van Kessel AH, Verheijen R, Ramaekers FC. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet.* 1989 Oct;83(3):297-9.

Strothmann A, Schneider HP. Hormone therapy: the European women's perspective. *Climacteric.* 2003 Dec;6(4):337-46.

Taylor M. – Alternatives to HRT: an evidence-based review. *Int. J. Fertil. Womens Med.* 2003;48(2):64-8.

Tempfer CB, Bentz EK, Leodolter S, Tscherne G, Reuss F, Cross HS, Huber JC. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. *Fertility and Sterility.* 2007;87(6):1243-1249.

Treatment of Menopause Associated Vasomotor Symptoms - Position Statement: The North American Menopause Society - *Menopause.* 2004 Jan/Feb;11(1):11-33.

Turgeon J.L., Mcdonell D.P., Martin K.A., Wise P.M. Hormone Therapy: Physiological Complexity Belies Therapeutic Simplicity. *Science*, 2004 May; 28:304(5675):1269-73. Review.

Uebelhack R, Blohmer JU, Graubaum HJ, Busch R, Gruenwald J, Wernecke KD. Black cohosh and St. John's wort for climacteric complaints: a randomized trial. *Obstet Gynecol.* 2006 Feb;107(2 Pt 1):247-55

Watkins BA, Reinwald S, Li Y, Seifert M. Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFAs on bone mass in ovariectomized rats. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2005;16:479-488.

Werner B., Campos A.C., Nadji M., Torres L.F.B., Practical use of immunohistochemistry in surgical pathology. *J Bras Patol Med Lab.* 2005 Out;5:353-64.

Weihua Z., Saji S., Makinen S, Cheng G., Jensen E.V., Warner M., Gustafsson J., Estrogen receptor (ER)  $\beta$ , a modulator of ER $\alpha$  in the uterus Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May; 23:97(11):5936-41.

Weihua Z, Andersson S, Cheg G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA. Update on estrogen signaling FEBS Lett 2003;546:17-24.

Wied GL, Bibbo M. Hormonal cytology. In: Bibbo M, editor. Comprehensive Cytopathology. 2<sup>nd</sup> ed. New York: W.B. Saunders; 1997. p.101–24

Williams MA. Quantitative methods in biology. In: Pratical methods in electron microscopy. Edited by Glaubert AM. Elsevier North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, The Netherlands, 1977; 233p.

Windler E , Zyriax BC , Eidenmuller B, Boeing H. Hormone replacement therapy and risk for coronary heart disease. Data from the CORA-study — A case-control study on women with incident coronary heart disease. Maturitas. 2007;57:239–246.

Winterhoff H, Butterweck V, Jarry H, Wuttke W. Pharmacologic and clinical studies using Cimicifuga racemosa in climacteric complaints. Wien Med Wochenschr. 2002;152(15-16):360-3.

Wolff LPG, Martins MC, Bedone AJ, Monteiro IMU. Avaliação do endométrio em menopausadas após o uso de isoflavonasS. Rev Assoc Med Bras 2006; 52(6): 419-23.

Wollschlaeger B. - The Dietary Supplement and Health Education Act and supplements: dietary and nutritional supplements need no more regulations. Int J Toxicol. 2003;22(5):387-90.

Wright TC, Cox JT, Massad S, Twigg LB, Wilkinson EJ.2001 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities. JAMA 2002;287:2120-29.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial *JAMA*. 2002;288:321-333.

Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas*. 2003 Mar; 14;44 Suppl 1:S9-20.

Wuttke W, Gorkow C, Seidlová-Wuttke D. Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. *Menopause*. 2006 Mar-Apr;13(2):185-96

Zasławski R, Surowiak P, Dziegiel P, Pretnik L, Zabel M. Analysis of the expression of estrogen and progesterone receptors, and of PCNA and Ki67 proliferation antigens, in uterine myomata cells in relation to the phase of the menstrual cycle. *Med Sci Monit*. 2001 Sep-Oct;7(5):908-13

Zhou Y, Lee MS. Mechanism for the Suppression of the Mammalian Stress Response by Genistein, an Anticancer Phytoestrogen From Soy. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998 March; 90(5):381-8.

Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002 Jan;80(1):125-30.

## **9.RESUMO**

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do *Trifolium pratense* e da *Cimicifuga racemosa* no epitélio vaginal e no endométrio de ratas *Wistar* ooforectomizadas, comparando os resultados com um grupo placebo e um grupo utilizando valerato de estradiol. As doses utilizadas foram equivalentes às que são rotineiramente administradas a mulheres (1 mg/dia de valerato de estradiol, 80 mg/dia de isoflavonas de *Trifolium pratense* e 4 mg/dia de deoxiacetina da *Cimicifuga racemosa*). Foram analisados os resultados através da microscopia ótica e Índice de Frost para o epitélio vaginal. A expressão dos receptores  $\alpha$ -estrogênicos e da proteína Ki67 no endométrio foram avaliadas por imunohistoquímica e morfometria. A citologia vaginal permaneceu atrófica com o uso dos fitomedicamentos embora o índice de células intermediárias tenha aumentado significativamente com o extrato de *Cimicifuga*. A histologia do endométrio permaneceu atrófica em ambos os extratos vegetais porém o extrato de *Trifolium pratense* apresentou significativo aumento da expressão de receptores  $\alpha$ -estrogênicos quando comparado ao placebo, sem que ocorresse aumento na expressão da proteína Ki67. Os fitoterápicos apresentaram imunoposição da proteína Ki67 menor que a observada no placebo.

## **10. SUMMARY**

The objective of this study was to analyze the effects of *Trifolium pratense* and *Cimicifuga racemosa* in vaginal epithelium and endometrium of castrated female *Wistar* rats, comparing these results with placebo and estradiol valerate. The doses used were equivalent to the doses used in women (1 mg/day of estradiol valerate, 80 mg/day of isoflavones from *Trifolium pratense* and 4 mg/day of deoxiactein from *Cimicifuga racemosa*). The results were analyzed via optical microscopy and Frost Index for vaginal epithelium. The expression of  $\alpha$ -receptors and Ki67 were assembled through immunohistochemical and morphometric analysis. Vaginal cytology remained atrophic in groups supplied with herbs, although the intermediate cells index rose significantly with *Cimicifuga* supplementation. The endometrium histology also remained atrophic in both herbal extracts but the *Trifolium* supplementation enhanced the expression of  $\alpha$ -estrogen receptors compared to placebo, without enhancement of protein Ki67 expression. The herbal extracts presented a lower Ki67 expression compared to placebo.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)