

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO ÚTERO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS APÓS USO DE EXTRATO DE GRAVIOLA

(Morphological and morphometric evaluation of female mice uterus after using soursop extract)

Izabel Pessoa da SILVA¹; Maria de Jesus Pereira GOMES²; Dandara Maria Silva ARAÚJO²; Leiz Maria Costa VERAS²; Leonardo Peres de SOUZA²; Franciele Basso Fernandes SILVA²; Luciana Rocha FAUSTINO^{2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, nº 1700, Campus do Itapery, Fortaleza/CE. CEP: 60.714-903; ²Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPar). *E-mail: lrfaustino@gmail.com

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de *Annona muricata* no útero de camundongos fêmeas por meio de análises macro e microscópicas. Vinte camundongos fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos: controle (solução salina), ciclofosfamida e extrato de folhas de graviola em duas concentrações diferentes (50 e 100mg/kg). Após sete dias de experimento, as fêmeas foram eutanasiadas e seus úteros coletados e submetidos a análise macroscópica, seguida de processamento histológico para análises morfológicas e morfométricas das camadas do útero e das glândulas endometriais. As características macroscópicas do útero foram mantidas em todos os grupos avaliados. Microscopicamente, não foram identificadas alterações patológicas nas células uterinas. No entanto, houve um aumento significativo na camada do miométrio após o tratamento com ciclofosfamida ($p<0,05$). O diâmetro interno das glândulas endometriais foi significativamente menor em ambos os grupos tratados com extrato de *A. muricata* quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$), enquanto o diâmetro total das glândulas foi significativamente menor somente na maior concentração de extrato de *A. muricata* quando comparado ao grupo controle ($p<0,05$). A administração do extrato de folhas de *A. muricata* não causou alterações morfológicas ao útero. Desta forma, o extrato não apresentou toxicidade uterina nas condições avaliadas.

Palavras-chave: Plantas Medicinais, agentes antineoplásicos, toxicidade.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of *Annona muricata* extract on the uterus of female mice by macro and microscopic analyzes. Twenty female mice were randomly assigned to four groups: control (saline solution), cyclophosphamide, and soursop leaf extract at two different concentrations (50 and 100 mg/kg). After seven days of the experiment, the females were euthanized and their wombs were collected and submitted for macroscopic analysis, followed by histological processing for morphological and morphometric analyses of uterine layers and endometrial glands. The macroscopic characteristics of the uterus were maintained in all groups evaluated. Microscopically, no pathological changes were identified in the uterine cells. However, there was a significant increase in the myometrium layer after the treatment with cyclophosphamide ($p<0.05$). The internal endometrial glands diameter was significantly smaller in both groups treated with *A. muricata* extract compared to the control group ($p<0.05$), while the total glands diameter was significantly smaller only at the highest concentration of *A. muricata* extract compared to the control group ($p<0.05$). The administration of *A. muricata* leaf extract did not cause morphological changes to the uterus. Thus, the extract did not present uterine toxicity under the conditions evaluated.

Keywords: Medicinal plants, antineoplastic agents, toxicity.

INTRODUÇÃO

O útero é um dos órgãos que compõe o sistema reprodutor feminino e é responsável pelo aporte necessário à manutenção e ao desenvolvimento do embrião e do feto (NELSON *et*

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

al., 2012; TAYLOR, 2018). Assim, sua atuação depende de um funcionamento saudável e, portanto, suas camadas, especificamente, o endométrio e o miométrio devem estar intactas (NELSON *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2017).

Esse órgão sofre com alterações hormonais cíclicas que induzem sua descamação, caracterizando, assim, o ciclo reprodutivo (NELSON *et al.*, 2012; GONZALEZ, 2016). À medida que os ovários diminuem sua função estimulante e secretória de hormônios sexuais ao longo da vida reprodutiva, o útero para de descamar e atinge a menopausa (NELSON *et al.*, 2012; TAKAHASHI e JOHNSON, 2015). Ao atingir essa fase, devido às alterações fisiológicas, o tecido uterino apresenta alterações morfológicas que inviabilizam o desenvolvimento da gravidez, causando, assim, a infertilidade nas mulheres a partir de 45 a 51 anos de idade (ABRAO *et al.*, 2013; POTTER *et al.*, 2018).

Além dos problemas reprodutivos serem causados de forma natural em virtude do envelhecimento, outras doenças relacionadas ao sistema reprodutor e suas terapias também podem levar ao comprometimento da fertilidade, como é o caso do câncer (ABRAO *et al.*, 2013; OKTEM *et al.*, 2018; POTTER *et al.*, 2018). O câncer é considerado um dos maiores problemas de saúde pública em o todo mundo, causando anualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde, 10 milhões de mortes, que devem crescer em 70% nas próximas décadas (SIEGEL *et al.*, 2017; WHO, 2020). Seu tratamento tem sido responsável pelo aumento na sobrevivência de pessoas diagnosticadas com a doença (MILLER *et al.*, 2016); no entanto, tratamentos como a quimioterapia, que se baseia no uso de substâncias que destroem as células que formam o tumor, i.e., os agentes quimioterápicos (GALMARINI *et al.*, 2012), podem causar efeitos colaterais como mucosite oral, toxicidade gastrointestinal, citotoxicidade em diversos outros órgãos e, ainda, gonadotoxicidade (GALMARINI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2018).

Devido a esses efeitos colaterais, a busca por substâncias naturais com atividade citotóxica ou antiproliferativa, que causem menos efeitos colaterais, tem aumentado (OHNISHI e TAKEDA, 2015). Dentre essas substâncias, destaca-se a *Annona muricata*, conhecida popularmente como graviola, devido a relatos de baixa citotoxicidade *in vitro* a células saudáveis (DAI *et al.*, 2011; CORIA-TÉLLEZ *et al.*, 2018). Por conta de seus bioativos, várias partes da *A. muricata* têm sido utilizadas para o tratamento de doenças humanas (GAVAMUKULYA *et al.*, 2017; CORIA-TÉLLEZ *et al.*, 2018). Além disso, estudos demonstraram seu potencial citotóxico em diferentes linhagens de células cancerígenas: próstata (YANG *et al.*, 2018); mama (KIM *et al.*, 2018); fígado (BANERJEE *et al.*, 2017), dentre outras.

Entretanto, apesar do potencial anticancerígeno da *A. muricata*, ainda não foram observados os efeitos do extrato dessa planta no útero de camundongos fêmeas, o qual pode atuar de forma negativa sob a fertilidade. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do uso do extrato de folhas de *A. muricata* na morfologia e morfometria do útero de camundongos fêmeas, por meio de análises macro e microscópicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos animais

No total, foram utilizados 20 camundongos fêmeas (*Mus musculus*), da linhagem Swiss, com idade entre 2 a 3 meses, obtidas do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram alimentados com ração apropriada e água filtrada *ad libitum* e mantidos em ciclo claro/escuro de 12h à temperatura de 22 °C ± 2 em gaiolas de tamanho apropriado, com 5 animais por gaiola e forradas com uma preparação mista de maravalha e xilana (proporção de 3:1).

O manejo dos animais durante as práticas experimentais foi realizado de acordo com o preconizado pela legislação e o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI (protocolo 221/16).

Extrato de *Annona muricata*

Foi realizada a coleta dos galhos da graviola na comunidade Lagoa da Prata, município de Parnaíba – PI (2°57'38"S 41°47'26"W), seguida de fitotaxonomia da planta pelo Herbário do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr). O procedimento de obtenção do extrato seguiu o protocolo de Pieme *et al.* (2014). Resumidamente, as folhas foram lavadas em água corrente, escorridas e pesadas (498g) para serem secas em estufa a 45 °C por 72 horas. Em seguida, as folhas foram trituradas e maceradas em etanol (1:10[p:v]) por três dias. A mistura foi filtrada até completa descoloração e a solução levada ao rotaevaporador. O rendimento do extrato etanólico foi de 22.053 mg ou 13,83% em relação ao peso das folhas secas. Em seguida, o extrato etanólico obtido foi diluído em solução salina 0,9% em duas doses (50 e 100mg/kg).

Delineamento experimental e coleta dos úteros

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=5, animais por grupo): controle (0,1mL de solução salina 0,9%), ciclofosfamida (75mg/kg em 0,9% solução salina) (PASCUALI *et al.*, 2018) e extrato etanólico da folha de *A. muricata* (EF) nas concentrações de 50mg/kg (EF50) e 100mg/kg (EF100). (MINARI e OKEKE, 2014). A solução salina e o EF foram administrados intragastricamente, uma vez ao dia, por gavagem, durante sete dias. Enquanto a ciclofosfamida, uma droga amplamente utilizada como agente anticâncer e que pode causar efeitos adversos (FENG *et al.*, 2016; PASCUALI *et al.*, 2018; EL-SEBAEY *et al.*, 2019), foi administrada como controle positivo em dose única intraperitoneal no 1° e 4° dia do experimento.

No 8° dia, após os sete dias da administração das substâncias administradas, os animais de todos os grupos foram pesados e eutanasiados por sobredose de anestésicos (30mg/kg de xilazina associado a 300mg/kg de quetamina). Em seguida, os animais foram dissecados e seus cornos uterinos foram retirados para as análises.

Morfopatologia uterina

Os úteros foram coletados, pesados e submetidos à análise morfológica macroscópica. Em seguida, os órgãos foram fixados em formol tamponado 10% por 12-24 h em temperatura ambiente, desidratados, diafanizados e inclusos em parafina. Os tecidos

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

uterinos foram cortados em micrótomo ajustado para 5µm, os quais foram montados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (HE) ou ácido periódico de Schiff (PAS) - hematoxilina.

Inicialmente, os úteros foram avaliados quanto à morfologia tecidual, considerando a presença de alterações como: fenômenos degenerativos, presença de inflamação, presença de congestão, hiperemia, hiperplasia, necrose, sendo essas avaliadas em 10 campos aleatórios por lâmina em microscópio óptico com aumento de 200x.

Em seguida, foram realizadas avaliações morfométricas do útero com auxílio do software Zen2Core v2.4 Application Service (ZEISS), em imagens capturadas por meio de microscópio de luz (Primo Star, ZEISS) acoplado a uma câmera digital (AxioCam 105 color, ZEISS). Os parâmetros avaliados foram a espessura do epitélio luminal do endométrio, do estroma do endométrio, do miométrio e das glândulas endometriais. O epitélio foi medido da superfície apical das células luminas até à lâmina basal. O estroma do endométrio foi medido desde a lâmina basal até o limite do miométrio, este medido do limite do endométrio ao extremo da camada. A cada cinco secções histológicas, todas as glândulas endometriais foram contadas e analisadas quanto sua morfologia e os diâmetros interno (lúmen da glândula) e total foram medidos. As análises morfométricas das glândulas seguiram o sistema de classificação de Neoplasia Endometrial Intraepitelial, introduzido pela Organização Mundial da Saúde (BAAK *et al.*, 2005).

Análise estatística

Foram aplicados o teste de Shapiro-Wilk para análise da normalidade dos dados e o teste de Levene para avaliar a homocedasticidade. Em seguida, foi realizada ANOVA seguida do Teste de Fisher através do programa IBM SPSS Statistic versão 23. Os valores foram representados como média ± desvio padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise macroscópica do útero

O peso dos úteros variou de $0,0825 \pm 0,0178$ g (controle) a $0,0942 \pm 0,0345$ g (ciclofosfamida), sem diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,9340$). Além disso, não houve diferença significativa entre os pesos relativos dos órgãos, cujos valores variaram de $0,2719 \pm 0,1013$ (controle) a $0,3538 \pm 0,1513$ (ciclofosfamida) ($p = 0,805$) (Tab. 01).

Essa observação de que o peso dos úteros dos animais não foi afetado pelos tratamentos demonstra que o extrato da graviola não apresentou prejuízos à massa tecidual uterina. No entanto, nossos achados se contrapõem ao observado na literatura que indica que o uso de ciclofosfamida causa diminuição no peso do útero de camundongos fêmeas de maneira dose/tempo dependente (PLOWCHALK *et al.*, 1992). Os autores do trabalho utilizaram única dose intraperitoneal em diferentes concentrações de ciclofosfamida, aplicadas intraperitonealmente, por um período de sete dias e observaram alterações significativas no peso uterino somente com doses maiores que 75mg/kg (PLOWCHALK *et al.*, 1992). O que nos leva a inferir que a dose ou o tempo de administração de ciclofosfamida

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

utilizados em nosso estudo pode não ter sido suficiente para causar perda de massa tecidual significativa do órgão.

Tabela 01: Média do peso do útero e do peso relativo do útero de camundongos fêmeas após tratamento com extrato etanólico de folhas de *A. muricata*.

Grupos	Peso do útero (mg)	Peso relativo do útero (mg)
Controle	0,0825±0,0178 ^a	0,2719±0,1013 ^a
Ciclo	0,0942±0,0345 ^a	0,3538±0,1513 ^a
EF 50	0,0900±0,0456 ^a	0,3208±0,1345 ^a
EF 100	0,0900±0,0388 ^a	0,3085±0,1718 ^a

Ciclo: 75mg/kg de ciclofosfamida em 0,9% solução salina; EF50: 50mg/kg de extrato etanólico de folhas de graviola; EF100: 100mg/kg de extrato etanólico de folhas de graviola; Valores expressos em média±DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Na literatura são poucos os trabalhos que relatam os efeitos de quimioterápicos sintéticos ou naturais sobre o útero em modelos animais. Especificamente para ciclofosfamida, de larga utilização como agente anticâncer (FENG *et al.*, 2016; EL-SEBAEY *et al.*, 2019), foram relatados efeitos negativos desse fármaco no tecido uterino de ratas, com o comprometimento das camadas desse órgão, e alterações hormonais (YILMAZ *et al.*, 2018), os quais podem levar a problemas reprodutivos.

Através da análise macroscópica, observou-se ainda que os cornos uterinos mantiveram suas características morfológicas normais em todos os animais avaliados, sem alterações, na cor, na textura ou na consistência dos órgãos (Fig. 01).



Figura 01: Morfologia macroscópica do corno uterino de camundongo fêmea tratada com 100mg/kg de extrato etanólico das folhas de *A. muricata* (EF100).

Outros autores também avaliaram morfológicamente órgãos internos de camundongos, como parte de seus estudos toxicológicos, após a utilização do dicloridrato de propionato (DE-EDCP) (STANKOVIĆ *et al.*, 2019), como quimioterápico, e do extrato de

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

Egletes viscosa (ARAÚJO *et al.*, 2008) e obtiveram órgãos com morfologia alterada e normal. O extrato de *A. muricata*, por sua vez, tem sido utilizado como droga anticâncer em diversas linhagens celulares de câncer (BANERJEE *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018), incluindo células de câncer cervical (QORINA *et al.*, 2020). Contudo, são escassos na literatura relatos sobre os efeitos do extrato dessa planta no útero de animais. Em estudos *in vivo*, *A. muricata* foi utilizada em doses que variaram entre 10 e 5000mg/kg para tratamento de diferentes doenças (TASLIMI *et al.*, 2019). Em estudos com camundongos, a DL50 calculada para extrato etanólico de folhas administrado intraperitonealmente foi de 1092mg/kg (SOUZA *et al.*, 2018). Em nosso trabalho, utilizamos 50 e 100mg/kg do extrato de folhas dessa planta em camundongos fêmeas, visto que concentrações superiores podem gerar efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios nos animais (DE SOUSA *et al.*, 2010). Ainda, Minari e Okeke (2014) demonstraram que o extrato etanólico de *A. muricata* (50 a 200mg/mL), concentrações similares às utilizadas em nosso estudo, pode prevenir a proliferação de células mamárias induzida.

Análise morfológica e morfométrica do útero

Na avaliação microscópica, a maior parte das fêmeas apresentou útero com endométrio espesso com pregas irregulares e estroma fibrocelular com núcleos eucromáticos, revestido superficialmente por epitélio colunar simples com aspecto retilíneo e núcleos celulares ora na mesma altura ora em alturas diferentes. O miométrio apresentou, em todos os grupos estudados, constituição normal, com a camada muscular lisa, revestida por tecido conectivo e epitélio de revestimento externo do órgão. As glândulas endometriais apresentaram morfologia tubular com epitélio glandular cúbico, bem como também foram observadas algumas glândulas de formato irregular, com presença de secreção PAS positiva em seu interior. Em todos os grupos experimentais, essas características glandulares se repetiram, em pelo menos um animal (Fig. 02). Em ambas as camadas uterinas foi possível observar os vasos sanguíneos com presença de células sanguíneas, cuja presença não caracterizava congestão.

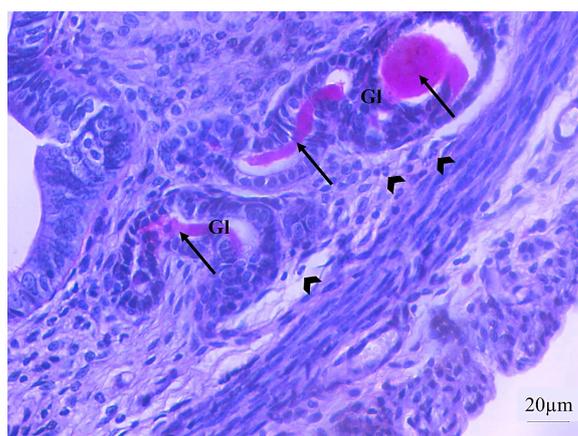


Figura 02: Corte histológico evidenciando o estroma endometrial, com destaque para secreção PAS positiva no lúmen das glândulas (GI; setas) e de células inflamatórias no tecido (setas). Coloração PAS-hematoxilina.

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

Foi observada a presença de células inflamatórias no estroma endometrial em todas as fêmeas (Fig. 02), de forma que a média do número de células inflamatórias variou de $10,8 \pm 12,4$ (controle) a $13,4 \pm 4,1$ (EF50), sem diferença significativa entre os grupos experimentais ($p=0,6707$). Dessa forma, as análises morfológicas microscópicas dos tecidos uterinos não apresentaram alterações patológicas, exceto a presença de células inflamatórias em todos os grupos experimentais. Corroborando com nossos achados, Yilmaz *et al.* (2018) demonstraram em ratas a presença de células inflamatórias no útero após uso de ciclofosfamida. Silva *et al.* (2015), que estudaram a presença dessas células no endométrio de gatas, consideraram a presença de células inflamatórias um processo normal, quando o número de células avaliadas não é alto, no caso, até 20 células por campo avaliado. Neste sentido, considera-se que as células observadas em nosso estudo não estão relacionadas a algum evento patológico. Além disso, a presença de algumas células inflamatórias pode ser atribuída à fase do ciclo estral, o qual está diretamente ligado ao estímulo hormonal (RIBEIRO *et al.*, 2010; COCCHIA *et al.*, 2012).

A avaliação morfométrica do endométrio demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto à espessura do epitélio luminal e à espessura do estroma do endométrio ($p=0,0950$ e $p=0,2924$, respectivamente) (Tab. 02). No entanto, foi observado um aumento significativo da espessura do miométrio quando o grupo tratado com ciclofosfamida foi comparado aos demais grupos ($p<0,05$).

Tabela 02: Resultados morfométricos das camadas e glândulas uterinas de camundongos fêmeas após tratamento com extrato etanólico de folhas de *A. muricata*.

Grupos	Espessura (μm)			Glândulas endometriais	
	Epitélio luminal do endométrio	Estroma do endométrio	Miométrio	Diâmetro interno (μm)	Diâmetro total (μm)
Controle	$24,21 \pm 4,43^a$	$204,83 \pm 58,21^a$	$140,47 \pm 45,27^b$	$22,27 \pm 4,07^a$	$41,74 \pm 9,52^a$
Ciclo	$22,81 \pm 3,51^a$	$202,63 \pm 54,34^a$	$246,68 \pm 79,84^a$	$15,37 \pm 5,22^{ab}$	$37,83 \pm 6,85^{ab}$
EF50	$18,61 \pm 4,18^a$	$205,26 \pm 52,13^a$	$177,71 \pm 36,76^b$	$12,65 \pm 2,46^b$	$34,36 \pm 3,23^{ab}$
EF100	$19,24 \pm 4,41^a$	$263,44 \pm 32,36^a$	$150,95 \pm 39,17^b$	$12,01 \pm 2,01^b$	$29,67 \pm 2,96^b$

Ciclo: 75mg/kg de ciclofosfamida em 0,9% solução salina; EF50: 50mg/kg de extrato etanólico de folhas de graviola; EF100: 100mg/kg de extrato etanólico de folhas de graviola; Valores expressos em média \pm DP.

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Devido à ciclicidade uterina, estudos têm demonstrado que somente a análise histológica não é suficiente para demonstrar alterações patológicas no útero (AVVAD-PORTARI *et al.*, 2003). Assim, no presente trabalho, além da observação histopatológica do tecido uterino, medidas morfométricas foram realizadas nas camadas uterinas e nas glândulas endometriais. Através da morfometria das camadas uterinas, nossos resultados demonstram que os úteros dos camundongos fêmeas apresentaram alteração somente na espessura do miométrio após administração de ciclofosfamida. Enquanto outros trabalhos demonstraram alteração na camada endometrial após uso desse quimioterápico (FAROKHI *et al.*, 2007;

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

YILMAZ *et al.*, 2018). No entanto, os efeitos específicos da ciclofosfamida na literatura não são bem definidos para parâmetros histológicos, nem sua ação sobre o sistema reprodutor de fêmeas.

Nas análises feitas, ainda foi possível observar a presença de glândulas endometriais com secreção PAS positiva no lúmen da glândula. Essa coloração tem sido utilizada para demonstrar, além da morfologia tecidual, substâncias essenciais secretadas no útero e que são importantes para o sucesso da fertilização (SILVA *et al.*, 2004; DAMOUS *et al.*, 2008). Silva *et al.* (2004) classificaram a presença da secreção uterina em graus de acordo com seu padrão de presença no lúmen do endométrio, no citoplasma das células do epitélio glandular e no lúmen das glândulas, e atribuíram essa positividade à atividade secretória do útero. No nosso estudo, pelo menos um animal de cada grupo apresentou glândulas com secreção PAS positiva no interior de seu lúmen. Portanto, a atividade secretória do útero não foi alterada em decorrência das drogas administradas no nosso experimento. Em adição, a ausência da secreção nas glândulas pode estar relacionada com a fase do ciclo estral do camundongo fêmea, o qual pode influenciar em algumas características uterinas e dificultar a visualização de alguns aspectos histomorfométricos (SATO *et al.*, 1997; DAMOUS *et al.*, 2008), não acompanhado em nosso trabalho.

Em relação às análises morfométricas das glândulas endometriais, o diâmetro interno foi significativamente inferior em ambos os grupos tratados com extrato de graviola quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Enquanto, para o diâmetro total, foi menor somente no grupo EF100 quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Tab. 01). A medida da complexidade da glândula, i.e., as medidas interna e total da glândula, é um dos componentes do D-score, que consiste na combinação de três características morfométricas reprodutíveis (BAAK *et al.*, 2005), importantes para a classificação da hiperplasia endometrial de maneira mais precisa (BAAK *et al.*, 1988). Através dessas medidas, nossos resultados demonstraram diminuição nos diâmetros das glândulas, somente após administração do extrato de folhas de graviola. No entanto, como não foram observadas alterações relativas à toxicidade nos grupos tratados com o extrato, como degenerações e outras alterações patológicas, a divergência quanto ao tamanho das glândulas indica mais uma influência do ciclo estral do que uma desvantagem do uso do extrato das folhas de graviola.

CONCLUSÕES

A administração intragástrica de 50 ou 100mg/kg do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* não causou alterações na morfologia do útero de camundongos fêmeas (*Mus musculus*), não sendo nítida a observação de achados patológicos pertinentes, bem como a morfometria não demonstrou alterações em parâmetros que pudessem estar relacionados à toxicidade do extrato.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. À Jessica Ferreira da Silva pela ajuda laboratorial. Ao Prof. Dr.

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

Jand Venes por disponibilizar espaço físico para o manejo dos animais. À Sociedade Parnaibana de Combate ao Câncer por ceder a ciclofosfamida. Ao Biólogo Dr. Pedro de Macêdo Carneiro pela ajuda com as análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

- ABRAO, M.S.; MUZII, L.; MARANA, R. Anatomical causes of female infertility and their management. *The International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v.123, n.2, p.18-24, 2013.
- ARAÚJO, A.A.S.; BONJARDIM, L.R.; MOTA, É.M.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; ESTEVAM, C.S.; CORDEIRO, L.; SEIXAS, S.R.S.; BATISTA, J.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous extract of *Egletes viscosa* Less (Asteraceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.4, p.707-15, 2008.
- AVVAD-PORTARI, E.; GOMES, N.D.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Simple hyperplasia versus proliferative endometrium: stereological study. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.39, n.1, p.73-9, 2003.
- BAAK, J.P.; MUTTER, G.L.; ROBBOY, S.; VAN DIEST, P.J.; UYTERLINDE, A.M.; ORBO, A.; PALAZZO, J.; FIANE, B.; LØVSLETT, K.; BURGER, C.; VOORHORST, F.; BAAK, J.P.; NAUTA, J.J.; WISSE-BREKELMANS, E.C.; BEZEMER, P.D. Architectural and nuclear morphometrical features together are more important prognosticators in endometrial hyperplasias than nuclear morphometrical features alone. *The Journal of Pathology*, v.154, n.4, p.335-41, 1988.
- BANERJEE, A.; SENGUPTA, A.; MAJI, B.; NANDI, A.; PAL, S.; MUKHERJEE, S. Possible cytotoxic activity of *Annona muricata* leaves in Huh-7 human liver cancer cells. *Hepatology and Pancreatic Science*, v.1, n.1, p.104, 2017.
- COCCHIA, N.; PACIELLO, O.; AULETTA, L.; UCCELLO, V.; SILVESTRO, L.; MALLARDO, K.; PARAGGIO, G.; PASOLINI, M. P. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, v.77, n.1, p.89-98, 2012.
- CORIA-TÉLLEZ, A.V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E.M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E.N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, v.11, n.5, p.662-6, 2018.
- DAI, Y.; HOGAN, S.; SCHMELZ, E.M.; JU, Y.H.; CANNING, C.; ZHOU, K. Selective growth inhibition of human breast cancer cells by graviola fruit extract in vitro and in vivo involving downregulation of EGFR expression. *Nutrition and Câncer*, v.63, n.5, p.795-801, 2011.

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

DAMOUS, L.L.; DA SILVA, S.M.; SIMÕES, R.S.; SAKANO, C.R.; SIMÕES, M.J.; MONTERO, E.F. Indirect evaluation of estrogenic activity post heterotopic ovarian autograft in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.23, n.4, p.372-7, 2008.

DE SOUSA, O.V.; VIEIRA, G.D.; DE PINHO, J.J.; YAMAMOTO, C.H.; ALVES, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models *International Journal of Molecular Sciences*, v.11, n.5, p.2067-78, 2010.

EL-SEBAEY, A.M.; ABDELHAMID, F.M.; ABDALLA, O.A. Protective effects of garlic extract against hematological alterations, immunosuppression, hepatic oxidative stress, and renal damage induced by cyclophosphamide in rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, v.2, n.15, p.15559-72, 2019.

FAROKHI, F.; SADRKHANLOU, R.; HASANZADEH, S.H.; SULTANALINEJAD, F. Morphological and morphometrical study of cyclophosphamide-induced changes in the ovary and uterus in the Syrian mice. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v.8, n.4, p.337-342, 2007.

FENG, L.; HUANG, Q.; HUANG, Z.; LI, H.; QI, X.; WANG, Y.; LIU, Z.; LIU, X.; LU, L. Optimized animal model of cyclophosphamide-induced bone marrow suppression. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.119, n.5, p.428-35, 2016.

GALMARINI, D.; GALMARINI, C.M.; GALMARINI, F.C. Cancer chemotherapy: a critical analysis of its 60 years of history. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.84, n.2, p.181-99, 2012.

GAVAMUKULYA, Y.; WAMUNYOKOLI, F.; EL-SHEMY, H.A. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.10, n.9, p.835-48, 2017.

GONZALEZ, G. Determining the stage of the estrous cycle in female mice by vaginal smear. *Cold Spring Harbor Protocols*, v.2016, n.8, p.732-434, 2016.

KIM, J.Y.; DAO, T.; SONG, K.; PARK, S.B.; JANG, H.; PARK, M.K.; GAN, S.U.; KIM, Y.S. *Annona muricata* leaf extract triggered intrinsic apoptotic pathway to attenuate cancerous features of triple negative breast cancer mda-mb-231 cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, v.2018, p.1-10, 2018.

MILLER, K.D.; SIEGEL, R.L.; LIN, C.C.; MARIOTTO, A.B.; KRAMER, J.L.; ROWLAND, J.H.; STEIN, K.D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v.66, n.4, p.271-89, 2016.

MINARI, J.B.; OKEKE, U. Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, v.15, n.4, p.327-34, 2014.

NELSON, S.M.; TELFER, E.E.; ANDERSON, R.A. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Human Reproduction Update*, v.19, n.1, p.67-83, 2012.

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

OHNISHI, S.; TAKEDA, H. Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. *Frontiers in Pharmacology*, v.6, n.14, p.1-5, 2015.

OKTEM, O.; KIM, S.S.; SELEK, U.; SCHATMANN, G.; URMAN, B. Ovarian and uterine functions in female survivors of childhood cancers. *The Oncologist*, v.23, n.2, p.214-24, 2018.

PASCUALI, N.; SCOTTI, L.; DI PIETRO, M.; OUBIÑA, G.; BAS, D.; MAY, M.; GÓMEZ MUÑOZ, A.; CUASNICÚ, P.S.; COHEN, D.J.; TESONE, M.; ABRAMOVICH, D.; PARBORELL, F. Ceramide-1-phosphate has protective properties against cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure. *Human Reproduction*, v.33, n.5, p.844-59, 2018.

PIEME, C.A.; KUMAR, S.G.; DONGMO, M.S.; MOUKETTE, B.M.; BOYOUUM, F.F.; NGOGANG, J.Y.; SAXENA, A.K. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.14, n.516, p.1-10, 2014.

PLOWCHALK, D.R.; MEADOWS, M.J.; MATTISON, D.R. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 2. Effects on uterine structure and function. *Reproductive Toxicology*, v.6, n.5, p.423-9, 1992.

POTTER, B.; SCHRAGER, S.; DALBY, J.; TORELL, E.; HAMPTON, A. Menopause. *Primary Care*, v.45, n.4, p.625-41, 2018.

QORINA, F.; ARSIANTI, A.; FITHROTUNNISA, Q.; TEJAPUTRI, N.A.; AZIZAH, N.N.; PUTRIANINGSIH, R. Cytotoxicity of Soursop Leaves (*Annona muricata*) against Cervical HeLa Cancer Cells. *Pharmacognosy Journal*, v.12, n.1, p.20-4, 2020.

RIBEIRO, A.P.C.; VICENTE, W.R.R.; SANTOS, I.W.; APPARÍCIO, M.F.; CARARETO, R.; PIGATTO, C.P. Bacteria and inflammatory response in the uterus of bitches after artificial insemination. *Archives of Veterinary Science*, v.15, n.2, p.62-8, 2010.

SATO, T.; FUKAZAWA, Y.; KOJIMA, H.; ENARI, M.; IGUCHI, T.; OHTA, Y. Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *The Anatomical Record*, v.248, n.1, p.76-83, 1997.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. *Cancer Statistics, CA: a Cancer Journal for Clinicians*, v.67, n.1, p.7-30, 2017.

SILVA, B.F.; SILVA, N.C.; SANTOS, T.R.; OLIVEIRA, A.P.; HEADLEY, S.A.; MEDEIROS, A.A.; MOTA, F.C.D.; LIMA, A.P.; SAUT, J.P.E. Citologia e histologia endometrial em gatas clinicamente saudáveis. *Bioscience Journal*, v.31, n.2, p.555-62, 2015.

SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; OLIVEIRA, T.S.; OCARINO, N.M.; NASCIMENTO, E.F.; NUNES, V.A. Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.5, p.628-39, 2004.

SOUZA, D.O.; DOS SANTOS SALES, V.; DE SOUZA RODRIGUES, C.K.; DE OLIVEIRA, L.R.; SANTIAGO LEMOS, I.C.; DE ARAÚJO DELMONDES, G.;

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.

MONTEIRO, Á.B.; DO NASCIMENTO, E.P.; SOBREIRA DANTAS NÓBREGA DE FIGUÊIREDO, F.R.; MARTINS DA COSTA, J.G.; PINTO DA CRUZ, G.M.; DE BARROS VIANA, G.S.; BARBOSA, R.; ALENCAR DE MENEZES, I.R.; BEZERRA FELIPE, C.F.; KERNTOPF, M.R. Phytochemical analysis and central effects of *Annona Muricata* Linnaeus: possible involvement of the gabaergic and monoaminergic systems. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v.17, n.4, p.1306-1317, 2018.

STANKOVIĆ, D.T.; RISTIĆ, S.M.; VUKADINOVIĆ, A.A.; MIRKOVIĆ, M.D.; VLADIMIROV, S.S.; MILANOVIĆ, Z.; RADOVIĆ, M.; MIJOVIĆ, M.; STANKOVIĆ, D.M.; SABO, T.J.; VRANJEŠ-ĐURIĆ, S.D.; JANKOVIĆ, D. Toxicity study of DE-EDCP as a potential drug for cancer therapy: Toxicity profile of DE-EDCP. *Human & Experimental Toxicology*, v.38, n.4, p.466-81, 2019.

TAKAHASHI, T.A.; JOHNSON, K.M. Menopause. *The Medical Clinics of North America*, v.99, n.3, p.521-34, 2015.

TASLIMI, P.; KANDEMIR, F.M.; DEMIR, Y.; İLERITÜRK, M.; TEMEL, Y.; CAGLAYAN, C.; GULÇIN, İ. The antidiabetic and anticholinergic effects of chrysin on cyclophosphamide-induced multiple organ toxicity in rats: Pharmacological evaluation of some metabolic enzyme activities. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v.33, n.6, p.1-7, 2019.

TAYLOR, H.S. Role of the uterus in fertility, pregnancy, and developmental programming. *Fertility and Sterility*, v.110, n.5, p.849-50, 2018.

VERHEIJEN, R.H. The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system. *Cancer*, v.103, n.11, p.2304-2312, 2005.

XIAO, S.; LI, R.; EL ZOWALATY, A.E.; DIAO, H.; ZHAO, F.; CHOI, Y.; YE, X. Acidification of uterine epithelium during embryo implantation in mice. *Biology of Reproduction*, v.96, n.1, p.232-43, 2017.

WHO. World Health Organization. Cancer, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 01 fev 2020.

YANG, C.; GUNDALA, S.R.; MUKKAVILLI, R.; VANGALA, S.; REID, M.D.; ANEJA, R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola (Annona muricata)* leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, v.36, n.6, p.656-65, 2015.

YILMAZ, E.; MELEKOGLU, R.; CIFTCI, O.; ERASLAN, S.; CETIN, A.; BASAK, N. The therapeutic effects of curcumin and capsaicin against cyclophosphamide side effects on the uterus in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.33, n.6, p.499-507, 2018.

ZHANG, Q.Y.; WANG, F.X.; JIA, K.K.; KONG, L.D. Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Frontiers in Pharmacology*, v.9, n.1253, p.1-25, 2018.

Recebido: mar./2021.

Publicado: jun./2022.