



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC**

SAMIRA DA SILVA MACIEL

**IMPACTO MORFOPATOLÓGICO DO EXTRATO DE FOLHAS DE GRAVIOLA
(*Annona muricata* L) NA RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**

PARNAÍBA

2018

SAMIRA DA SILVA MACIEL

**IMPACTO MORFOPATOLÓGICO DO EXTRATO DE FOLHAS DE GRAVIOLA
(*Annona muricata* L) NA RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC da Universidade Federal do Piauí – UFPI como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Histologia aplicada à Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Faustino

PARNAÍBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

M152i Maciel, Samira da Silva

Impacto morfológico do extrato de folhas de graviola (*Annona muricata L*) na reserva ovariana de camundongos fêmeas [manuscrito] / Samira da Silva Maciel. – 2018.

87 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Rocha Faustino

SAMIRA DA SILVA MACIEL

**IMPACTO MORFOPATOLÓGICO DO EXTRATO DE FOLHAS DE GRAVIOLA
(*Annona muricata* L) NA RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Rocha Faustino
Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso
Presidente

Prof. Dra. Franciele Basso Fernandes Silva
Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso
Membro externo

Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras
Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso
Membro interno

Prof. Dr. Leonardo Peres de Souza
Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso
Membro externo

Dedico, a Ele e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Luciana, a quem estimo, por me ensinar o significado de ser orientadora, pela sensatez e ajuda na realização desse trabalho.

À Profa. Franciele pela disposição e tranquilidade ao ensinar Patologia.

Ao Prof. Leonardo pelos préstimos no laboratório de Histologia e disponibilidade em tirar dúvidas.

À Profa. Leiz por me apresentar uma pequena parte do seu mundo e ver um extrato de outra forma.

Ao Prof. Pedro por executar a análise estatística e dá apoio geral ao trabalho.

Ao Prof. Thiago Almendra por fornecer o quimioterápico ciclofosfamida.

Aos professores parceiros, Daniel Vasconcelos e Jand Medeiros, por cederem seus espaços e estrutura laboratorial para a realização deste trabalho.

A todos os técnicos de laboratório do Campus Ministro Reis Velloso (futura Universidade Federal do Delta do Parnaíba) por me acolherem e tornarem a rotina de estudo e de trabalho mais leve.

Aos meus queridos Dandara, Iago e Izabel, companheiros de projeto, no qual pudemos trocar experiências científica e de vida.

À família Rodrigues pelo companheirismo e apoio ao longo destes dois anos e mais de 18 anos de laços afetivos.

Ao Luís Paulo pelo entendimento, carinho e amor dedicados em todo esse momento.

“O fardo é proporcional às forças, como a recompensa será proporcional à resignação e à coragem.”

Allan Kardec

RESUMO

A utilização de algumas terapias anticâncer, por vezes, está associada à morte de células germinativas, levando a uma extensiva perda da reserva ovariana. Como consequência, as mulheres sofrem aumento da taxa de infertilidade. Dessa forma, a gonadotoxicidade dos quimioterápicos é uma questão importante para mulheres em idade reprodutiva, uma vez que esta pode levar ao esgotamento de seu potencial reprodutivo. Diante do exposto, a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos vem aumentando o interesse por substâncias naturais com atividade antitumoral. A *Annona muricata*, popularmente conhecida como graviola, tem se destacado por sua elevada atividade citotóxica, inclusive em células tumorais de câncer de mama, e por sua especificidade em relação às células tumorais. Contudo, de acordo com nosso conhecimento, ainda não há estudos sobre o efeito dessa planta sobre a reserva ovariana e, conseqüentemente, sobre a fertilidade feminina. O objetivo desse estudo foi avaliar o impacto do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* sobre a da reserva ovariana de camundongos fêmeas. Para tanto, foram utilizados 24 animais da linhagem Swiss, com idade entre 2 a 3 meses, os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de acordo com a substância a ser administrada: I - solução salina 0,9% (veículo), II - ciclofosfamida (75 mg/kg), III - extrato da folha de graviola (50 mg/kg) e IV - extrato da folha de graviola (100 mg/kg). Ao final, os animais foram eutanasiados e seus ovários e outros órgãos foram coletados e analisados. Foi realizada a análise histológica dos ovários através da avaliação do número de folículos, morfologia folicular e densidade das células do estroma ovariano. Adicionalmente foi realizada a análise anatomopatológica dos diferentes órgãos coletados. Os resultados foram expressos como média e frequência absoluta e considerados significativos quando $p < 0,05$. Os grupos tratados com o extrato não mostraram morte folicular ou diminuição da densidade das células do estroma em relação ao veículo, enquanto o grupo tratado com a ciclofosfamida mostrou maior número de morte folicular ($p < 0,05$). Adicionalmente, a análise anatomopatológica dos órgãos dos animais tratados com o extrato 50 mg/kg não apresentou alterações distinguíveis em relação ao veículo. Em contrapartida, os grupos do extrato 100 mg/kg e da ciclofosfamida apresentaram alterações histológicas no fígado comparados ao grupo salina. O grupo ciclofosfamida apresentou, ainda, muco esbranquiçado nos órgãos da cavidade abdominal em contraposição aos demais grupos. Dessa forma, o estudo mostrou que o extrato etanólico de folhas de graviola preservou a reserva ovariana de camundongos fêmeas em ambas as concentrações, não sendo tóxico ao ovário de acordo com os parâmetros utilizados e, ainda, que a dose de 50 mg/kg é a de melhor escolha para estudos posteriores.

Palavras-chave: Terapias anticâncer. Fertilidade. Falência ovariana prematura.

ABSTRACT

The use of some anticancer therapies is sometimes associated with the death of germ cells, leading to extensive loss of ovarian reserve. As a consequence, women experience increased rate of infertility. Thus, gonadotoxicity of chemotherapeutic agents is an important issue for women of reproductive age, since this may lead to the exhaustion of their reproductive potential. In view of the above, the need for development of new drugs has increased the interest for natural substances with antitumor activity. *Annona muricata*, popularly known as soursop, has been noted for its high cytotoxic activity, including breast cancer tumor cells, and for its specificity in relation to tumor cells. However, according to our knowledge, there are no studies on the effect of this plant on the ovarian reserve and, consequently, on female fertility. The objective of this study was to evaluate the impact of the ethanolic extract of leaves of *A. muricata* on the ovarian reserve of female mice. For this purpose, 24 Swiss animals were used, aged 2 to 3 months, which will be randomly divided into four experimental groups according to the substance to be administered: I - saline solution 0.9% (vehicle), II - cyclophosphamide (75 mg / kg), III - graviola leaf extract (50 mg / kg) and IV – soursop leaf extract (100 mg / kg). At the end, the animals were euthanized and their ovaries and other organs were collected and analyzed. Was performed the histological analysis of the ovaries through the evaluation of the number of follicles, follicular morphology and density of ovarian stromal cells. Additionally, was performed the anatomopathological analysis of the different organs collected. The results were expressed as mean and absolute frequency and considered significant when $p < 0.05$. The groups treated with the extract did not show follicular death or decreased stromal cell density in relation to the vehicle, while the cyclophosphamide treated group showed a higher number of follicular death ($p < 0.05$). In addition, anatomopathological analysis of the organs of the animals treated with the 50 mg / kg extract did not show any distinguishable changes in relation to the vehicle. In contrast, the 100 mg / kg extract and cyclophosphamide groups presented histological changes in the liver compared to the saline group. The cyclophosphamide group also had whitish mucus in the organs of the abdominal cavity in contrast to the other groups. Thus, the study showed that the ethanolic extract of soursop leaves preserved the ovarian reserve of female mice at both concentrations and was not toxic to the ovary according to the parameters used, and also that the dose of 50 mg / kg is the one of better choice for further studies.

Key words: Anticancer therapies. Fertility. Premature ovarian failure.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cânceres do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil: mama, colo do útero, corpo do útero e ovário.....34

CAPÍTULO 2

Figura 1. Folhas, frutos e sementes de *Annona muricata*.....45

CAPÍTULO 3

Figura 1. Desenho esquemático evidenciando os quatro grupos experimentais estudados.....56

Figura 2. Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tecido ovariano de camundongo fêmea mostrando folículos.....60

Figura 3: Espectros de absorção UV-vis do extrato etanólico de *A. muricata* na concentração 0,187 mg extrato / 1 ml etanol 95%.....62

Figura 4: Boxplot mostrando análise da morfologia folicular ovariana.....63

Figura 5: Fotomicrografias representativas de secções histológicas do ovário evidenciando as células do estroma ovariano nos diferentes grupos analisados64

Figura 6: Fotomicrografias representativas de secções histológicas do córtex do ovário mostrando células do estroma.....64

Figura 7: Imagens comparativas do baço.....65

Figura 8: Fotomicrografias representativas de secções histológicas do fígado nos diferentes grupos analisados.....66

Figura 9: Boxplot mostrando análise morfométrica do útero.....67

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1. Possíveis combinações de agentes quimioterápicos no tratamento dos cânceres do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil.....29

Quadro 2. Efeitos tóxicos dos agentes quimioterápicos de acordo com o tempo de exposição à droga.....30

CAPÍTULO 2

Quadro 1. Compostos químicos com atividade anticancerígena isolados de *A. muricata*.....47

CAPÍTULO 3

Quadro 1: Resultado da avaliação fitoquímica qualitativa demonstrando presença de metabólitos secundários..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALC	Alcaloides
AGE	Acetogenina Anonácea
AMH	Hormônio Anti-Mulleriano
ANOVA	Análise de Variância
Bi-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
BRCA	Breast Cancer
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFA	Ciclofosfamida
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DHL	Desidrogenase Láctica
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FA	Fosfatase Alcalina
FIGO	Federação Interacional de Ginecologia e Obstetrícia
FOP	Falência Ovariana Prematura
FSH	Hormônio Folículo-estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HE	Hematoxilina-Eosina
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HER2	<i>Human Epidermal Growth Fator Receptor-type 2</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papiloma Vírus Humano
HÁ	Hospital de Amor (Hospital do Câncer de Barretos)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LH	Hormônio Luteinizante
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NIC	Neoplasia Intraepitelial
RN	Resolução Normativa
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SBC	Sociedade Brasileira de Cancerologia
RM	Ressonância Magnética
TFE	Teste do Hormônio Folículo-estimulante Exógeno

TC	Tomografia Computadorizada
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USG	Ultrassonografia
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3 CAPÍTULO 1	
Cânceres do sistema reprodutor feminino e os efeitos das principais terapias anticâncer sobre a função reprodutiva: uma revisão de literatura.....	17
4 CAPÍTULO 2	
Produtos naturais na quimioterapia do câncer.....	43
5 CAPÍTULO 3	
Impacto do extrato de folhas de graviola (<i>Annona muricata</i> L.) na reserva ovariana de camundongos fêmeas.....	51
6 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICES.....	84

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, com ocorrência de 14,1 milhões de casos por ano em todo o mundo (SBC, 2018). No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte por doença, com estimativa, para o biênio 2018/2019, de 600 mil novos casos (BRASIL, 2018). Destes, excetuando-se os melanomas, a incidência em mulheres para o mesmo ano será principalmente dos cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) (BRASIL, 2018). Entre os cânceres que acometem o sistema reprodutor feminino os de maior ocorrência no Brasil, em ordem decrescente, são o de mama, o do colo do útero, o do corpo do útero (endométrio) e o de ovário (BRASIL, 2018).

Inicialmente, as terapias contra o câncer eram feitas apenas com base em radioterapia e cirurgia (BONASSA e SANTANA, 2005). A partir da década de 40, foi inserido o uso dos quimioterápicos na terapêutica, sendo que os primeiros antineoplásicos foram os agentes alquilantes (REMERS, 1998). No entanto, o tratamento quimioterápico, causa muitos efeitos colaterais nos pacientes devido à falta de especificidade dos fármacos utilizados, que acometem também tecidos normais (ALMEIDA *et al.*, 2005). Entre os efeitos colaterais estão: toxicidade hematológica, gastrintestinal, neurológica, vesical, dermatológica, no coração, fígado e pulmões, alterações metabólicas, reações alérgicas, anafilaxia e disfunção reprodutiva (CRIADO *et al.*, 2010).

A perda da função reprodutiva afeta tanto o sexo masculino como o feminino (BLUMENFELD, 2007; OKTAY *et al.*, 2007). Porém, nas mulheres, a gonatotoxicidade dos quimioterápicos pode resultar na falência ovariana prematura (FOP), definida como a diminuição da reserva ovariana, ou seja, do *pool* dos folículos ovarianos disponíveis para recrutamento, com redução da quantidade e da qualidade dos gametas femininos (CHUANG *et al.*, 2003).

No intuito de eliminar ou reduzir os efeitos colaterais destes quimioterápicos há a necessidade da procura de novas drogas à base de substâncias naturais que tenham atividade antitumoral eminente e, ao mesmo tempo, não danifiquem células saudáveis, incluindo as células germinativas. Entre as substâncias naturais testadas, tem-se a *Annona muricata*, conhecida popularmente como graviola, já relatada como planta medicinal por seu amplo uso etnomédico

(LORENZI e MATOS, 2008). Em relação às atividades antineoplásicas, a graviola apresentou, por exemplo, toxicidade contra células cancerosas do pulmão, linhagem A549 (WU *et al.*, 1995), contra células cancerosas do pâncreas, linhagens MIA e PaCa-2 (ZENG *et al.*, 1996), contra células cancerosas do colón, linhagem HT-29 (KIM *et al.*, 1998), atividade quimiopreventiva na proliferação de células do tecido mamário (MINARI e OKEKE, 2014) e contra células do câncer de próstata (ASARE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2014),

Adicionalmente, o estudo de extratos e bioativos de *A. muricata*, bem como de outras plantas, a serem testados como antitumorais, sobretudo em mulheres em idade reprodutiva, deve também ter como foco suas respostas gonadotóxicas como forma de contornar a FOP e, conseqüentemente, desenvolver tratamentos especificamente desenhados para prevenir a infertilidade feminina.

Para evidenciar melhor a contribuição científica e tecnológica deste trabalho, os aspectos relacionados aos cânceres do sistema reprodutor feminino, suas terapias e seus efeitos colaterais, enfatizando seu efeito na reserva ovariana feminina, bem como a utilização de produtos naturais na quimioterapia do câncer serão abordados a seguir.

2 OBJETIVOS

- Conhecer os cânceres do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil e as principais terapias anticâncer;
- Entender os efeitos colaterais que as terapias anticâncer ocasionam à reserva ovariana;
- Enxergar os produtos naturais como alternativa aos tratamentos antineoplásicos convencionais;
- Investigar o impacto do extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L na reserva ovariana de camundongos fêmeas.

3 CAPÍTULO 1

Cânceres do sistema reprodutor feminino e os efeitos colaterais das principais terapias anticâncer sobre a função reprodutiva: uma revisão de literatura

CÂNCERES DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E OS EFEITOS COLATERAIS DAS PRINCIPAIS TERAPIAS ANTICÂNCER SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Maciel, S. S. ¹; Ferreira, I. L. S. ²; Faustino, L.R.^{1,2}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC – Universidade Federal do Piauí (UFPI) – Parnaíba/PI – Brasil

² Curso de Medicina – Universidade Federal do Piauí (UFPI) – Parnaíba/PI – Brasil

RESUMO

Apesar dos avanços na descoberta da etiologia e patologia do câncer, a incidência desta doença aumenta anualmente devido à sua complexidade e, conseqüentemente, à falta de terapias definitivas. Adicionalmente, as terapias utilizadas para o tratamento das neoplasias causam efeitos colaterais locais e sistêmico. Em mulheres, estes efeitos podem levar, de maneira direta ou indireta, à disfunção reprodutiva. No caso da utilização de radioterapia ou quimioterapia essa disfunção pode acontecer pela falência ovariana prematura (FOP). A presente revisão teve como objetivo fazer uma abordagem sobre os cânceres do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil, enfatizando, especialmente, as terapias anticâncer e seus efeitos colaterais sobre as mulheres.

Palavras-chave: câncer; mulheres, falência ovariana prematura.

ABSTRACT

Despite advances in the discovery of the etiology and pathology of cancer, the incidence of this disease increases annually due to its complexity and, consequently, the lack of definitive therapies. In addition, therapies used to treat neoplasms cause local and systemic side effects. In women, these effects may lead, directly or indirectly, to reproductive dysfunction. In the case of the use of radiotherapy or chemotherapy this dysfunction can happen due to premature ovarian failure (POF). The objective of the present review was to analyze the cancers of the female reproductive system with the highest incidence in Brazil, emphasizing, especially, anticancer therapies and their side effects on women.

Keywords: cancer; women, premature ovarian failure.

3.1 Introdução

O câncer tem se mostrado um problema de saúde pública que permeia muito mais do que a doença e seu tratamento. Nota-se que, mesmo com o avanço na elucidação da fisiopatogenia do câncer, sua heterogeneidade não permite, ainda, tratamentos definitivos, sendo relatado aumento anual no número de casos desta doença. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a previsão para o biênio 2018-2019 é uma incidência de 600 mil novos casos de câncer e, destes, 191,78 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2018). Os cânceres que mais acometem mulheres no Brasil, em ordem decrescente, são o de mama, o do colo do útero, o do corpo do útero e o de ovário (BRASIL, 2018).

O tratamento destes cânceres pode causar alterações nos níveis hormonais, períodos menstruais irregulares ou ausentes, menopausa precoce ou irreversível (HCB, 2018) e falência ovariana prematura (FOP) (EBRAHIMI e ASBAGH, 2011). A busca por tratamentos mais eficazes, com maiores possibilidades de sobrevida, cura e preservação da fertilidade feminina, particularmente, induz à necessidade do descobrimento de novas drogas alternativas à radioterapia, cirurgia e aos agentes quimioterápicos usualmente utilizados e de novas terapias como imunoterapia (GIACOMINI e MENEZES, 2012), hormonioterapia (BONASSA e SANTANA, 2005) e terapia por fotorradiação (MACHADO, 2000).

Considerando as dificuldades citadas, este estudo teve como objetivo fazer uma abordagem sobre a etiologia, sintomas, diagnóstico, classificação histológica, estadiamento e tratamento dos principais cânceres em mulheres, os quais estão ligados à função reprodutiva, e sobre a multiplicidade das terapias anticâncer utilizadas para o tratamento dos mesmos, enfatizando seus efeitos colaterais.

3.2 Cânceres do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil

O primeiro registro do câncer vem do século 7 a.c. e a primeira observação documentada de transmissibilidade hereditária do câncer documentada foi elucidada pelo médico Hilário de Gouveia, em 1872 (MUKHERJEE, 2012). Podemos observar que, mesmo sendo estudado há séculos, a racionalização do conceito do câncer ainda vem sendo melhorada pelos cientistas devido à sua complexidade.

É justamente por causa da sua heterogeneidade, que os cânceres podem ser de 200 tipos diferentes se forem considerados os diferentes tipos de células do corpo e a capacidade do câncer de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA *et al.*, 2005). Especificamente para os cânceres do aparelho reprodutor feminino, tem-se o câncer de mama, de colo do útero, do corpo do útero (endométrio), de ovário, de tuba uterina, de vulva e de vagina.

No Brasil, os cânceres ginecológicos de maior ocorrência são o de mama, colo do útero, endométrio e de ovário, respectivamente (BRASIL, 2018), sendo estes descritos nos subtópicos a seguir e suas principais características resumidas no mapa conceitual (figura 1) ao final do capítulo.

3.2.1 Câncer de Mama

De acordo com o INCA (2018), o câncer de mama é o câncer de maior ocorrência no Brasil entre as mulheres, estimando-se cerca de 59.700 novos casos para 2018, e a maior causa de morte por tumor maligno das mesmas.

Os fatores de risco deste tipo de câncer podem estar associados a fatores endócrinos e histórico reprodutivo, fatores ambientais ou fatores genéticos/hereditários (BRASIL, 2018). O primeiro corresponde ao estímulo do estrogênio, seja o sintetizado pelo próprio corpo ou o ingerido, podendo ser ocasionados pelo histórico de menarca precoce, a menopausa tardia, a primeira gravidez após os trinta anos, a não concepção de filhos (nuliparidade), o uso de anticoncepcionais orais e, ainda, a terapia de reposição hormonal após a menopausa. Os fatores ambientais envolvem o estilo de vida, como a falta de atividade física, a obesidade e o etilismo. Por outro lado, a lactação e a atividade física, são fatores protetores para o câncer de mama, tanto na fase pré como pós-menopausa (WHO, 2007). Os fatores endócrino e histórico reprodutivo somados aos fatores ambientais correspondem a cerca de 90% dos casos de câncer de mama em todo o mundo (WHO, 2007).

Os fatores genéticos/hereditários (5 a 10%) estão relacionados principalmente a alterações de genes supressores de tumor como os genes *TP53* (THOMPSON, 1993), *BRCA1* (HALL *et al.*, 1990; MIKI *et al.*, 1994), *BRCA2* (WOOSTER *et al.*, 1995; TAVTIVIAN *et al.*, 1996) e *HER-2* (INCA, 2018). De acordo com Vieira (2012),

o risco de mulheres com mutações no gene *BRCA1* desenvolver esta neoplasia é de, aproximadamente, 56 a 85%.

Os principais sintomas são adenopatia e tumoração não dolorosa de limites irregulares (SILVA, SILVA e VIANA, 2010), descarga papilar sanguinolenta (DE ANDREA *et al.*, 2006), edema na pele da mama (YAMADA *et al.*, 2013), retração, prurido e erosão da papila mamária e linfonodos axilares aumentados de tamanho.

O diagnóstico do câncer de mama começa com o exame clínico que consiste no exame físico e ginecológico, com palpação das mamas e axilas. Havendo alterações palpáveis, é realizada a mamografia (BRASIL, 1995). A mamografia é padronizada por um sistema chamado BI-RADS® (*Breast Imaging Reporting and Data System*), utilizado mundialmente. Esse sistema avalia riscos, evolução do tumor e orienta condutas (OREL, REYNOLDS e SULLIVAN, 1999).

Quando há dúvidas em relação ao resultado da mamografia, faz-se necessários exames complementares como ultrassonografia (USG), ressonância magnética (RM), tomografia computadorizada (TC) e cintilografia. Um método que vem crescendo e sendo utilizado como *screening* paralelamente à mamografia é a USG. Em casos de pacientes com mama densa, prótese mamária, presença de metástase axilar na ausência de tumor primário da mama ou nas pacientes com diagnóstico de câncer de mama com mamas densas para definir pelo tratamento conservador ou mastectomia, a RM torna-se necessária. O método de escolha em mulheres com lesões palpáveis e idade inferior a 35 anos é a USG, enquanto casos contrários são avaliados inicialmente por mamografia (VIEIRA *et al.*, 2012).

Os tumores mamários são predominantemente epiteliais e podem ser divididos em tumores epiteliais e tumores epiteliais raros (GOBBI, 2012). Os primeiros incluem os carcinomas invasivos: carcinoma microinvasivo, carcinoma mamário invasivo, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma cribriforme invasivo, carcinoma com elementos medulares, carcinoma mucinoso, carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete, carcinoma micropapilar invasivo, carcinoma com diferenciação apócrina, carcinoma metaplásico sem tipo especial, diferenciação condroide, diferenciação óssea, diferenciação em outros tipos mesenquimais, carcinoma metaplásico misto e carcinoma mioepitelial (GOBBI, 2012).

Os tumores epiteliais raros incluem carcinoma com elementos neuroendócrinos, carcinoma secretor, carcinoma papilar invasivo, carcinoma de células acinares, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma oncocítico, carcinoma rico em lípidos, carcinoma de células claras rico em glicogênio, carcinoma sebáceo e tumores tipo glândula salivar/anexos cutâneos (GOBBI, 2012).

O estadiamento, o qual determina a extensão do câncer presente no corpo do indivíduo e onde o mesmo está localizado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018), inicia-se com exame físico (avaliação da pele, glândulas mamárias e dos linfonodos axilares, supraclaviculares e cervicais) (VIEIRA *et al.*, 2012). Em seguida, realiza-se métodos de imagem (radiografia ou TC de tórax, US ou TC de abdome ou pelve, cintilografia óssea), dosagens sanguíneas de desidrogenase láctica (DHL) e fosfatase alcalina (FA), seguido, finalmente, com exames histopatológicos da mama ou de outros tecidos (VIEIRA *et al.*, 2012).

Como terapias para o câncer de mama têm-se a cirurgia e a radioterapia para tratamento locorregional e a quimioterapia e a hormonioterapia para o tratamento sistêmico (VIEIRA *et al.*, 2012). No entanto, a terapia adequada dependerá do estadiamento, tamanho, tipo e grau histológico do tumor, além do estado linfonodal, níveis dos receptores de estrogênio e progesterona no tecido tumoral, HER-2-neu, estado menopausal e condições clínicas gerais da paciente (VIEIRA *et al.*, 2012).

3.2.2 Câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero é o segundo câncer do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil, com expectativa de 16.370 novos casos para 2018 (BRASIL, 2018). Tem como principal fator de risco o papiloma vírus humano (HPV), associado à prática sexual (WALBOOMERS *et al.*, 1999). Dentre os sorotipos do HPV, o 16 e o 18 são os mais relacionados ao surgimento de câncer invasor, associando-se com até 79,8% de todos os cânceres cervicais (WALBOOMERS *et al.*, 1999; BOSH *et al.*, 2002). Os fatores imunológicos, fatores genéticos (polimorfismo da proteína p53), infecção por outros vírus como o HIV, tabagismo e uso de contraceptivos orais potencializam a infecção pelo HPV (PINTO, TULIO e CRUZ, 2002).

Inicialmente, o câncer do colo uterino é assintomático. No entanto, com a progressão da doença ocorre sangramento vaginal irregular. Este sangramento pode acontecer nas relações sexuais, no período intermenstrual, no menacme ou após a menopausa e pode tornar-se espontâneo com o avanço do câncer. Na fase mais avançada, ocorre dor, leucorreia de odor fétido e caquexia (VIEIRA *et al.*, 2012).

O diagnóstico desta neoplasia é feito, inicialmente, pelo exame citológico chamado de Papanicolau, que é comum em consultas de rotina como preventivo anual (BRASIL, 2018; PINHO e MATTOS, 2002). Quando se detecta lesões nesse exame, passa-se a fazer um diagnóstico por imagem através da colposcopia, a qual permite a detecção da extensão e localização das lesões, e, ainda, a realização de biópsias que irá possibilitar o exame histopatológico para avaliação final (PINHO e MATTOS, 2002). Quando há divergência entre o exame citológico e o exame histológico, aceita-se este último como padrão (RAMA *et al.*, 2008). Ainda, em casos com sangramento anormal, deve-se fazer diagnóstico diferencial de outras patologias, como a doença inflamatória pélvica, leiomiomas, pólipos, dentre outros, as quais também possuem esse sintoma (VIEIRA *et al.*, 2012).

O câncer do colo do útero começa em uma condição pré-invasiva limitada ao epitélio cervical (classificação histológica) denominada neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) ou como lesão intra-epitelial escamosa (diagnóstico citológico) (VIEIRA *et al.*, 2012). De acordo com avaliação histopatológica, a NIC pode ser avaliada em graus I (lesão de baixo grau), II e III (lesões de alto grau) (VIEIRA *et al.*, 2012); enquanto a padronização do seu estadiamento segue a classificação da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, 2014).

No tratamento da neoplasia do colo do útero com lesões pré-invasivas pode-se utilizar desde antibióticos, cremes vaginais, excisão ou cauterização da lesão até cirurgia e conização a laser (VIEIRA *et al.*, 2012). Enquanto nas lesões invasivas, o tratamento dependerá do estadiamento do tumor, das condições da paciente e de seu desejo de manter a função reprodutiva. Para estas lesões pode-se utilizar cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia (BRASIL, 2018).

3.2.3 Câncer do corpo do útero ou do endométrio

O câncer do corpo do útero tem estimativa de 6.600 novos casos para 2018 (BRASIL, 2018). Seu principal fator de risco é a hiperexposição estrogênica (MACMAHON, 1974; VIEIRA *et al.*, 2012), a qual pode ser exógena (terapia de reposição hormonal) ou decorrente de alterações endógenas (síndrome de ovários policísticos ou tumores produtores de estrógeno); principalmente quando não há um contrapeso progestogênico adequado (VIEIRA *et al.*, 2012).

O risco genético deste câncer é de, aproximadamente, 5% em mulheres de até 54 anos. Por outro lado, mais de 40% dos casos são atribuídos à obesidade (e dentre estes casos, 80% são mulheres em estado pós-menopausal) (VIEIRA *et al.*, 2012).

Os sintomas das mulheres acometidas por essa neoplasia podem incluir sangramento anormal na fase da pós-menopausa, corrimento purulento, dor pélvica, aumento do volume abdominal e da espessura endometrial, piométrio, astenia e emagrecimento (VIEIRA *et al.*, 2012).

Para o diagnóstico clínico deste câncer, realiza-se o histórico familiar das pacientes que estão dentro do grupo de risco uma vez que os exames físicos são sensíveis apenas em casos avançados (VIEIRA *et al.*, 2012). Um exame de imagem amplamente utilizado para avaliar a espessura endometrial é o teste de progesterona associado à USG transvaginal. A TC e RM podem ser úteis para o estadiamento do tumor; enquanto em casos específicos pode-se fazer a avaliação histológica endometrial por meio de biópsia (VIEIRA *et al.*, 2012).

Como classificação das neoplasias endometriais tem-se o carcinoma adenoescamoso e o adenocarcinoma, sendo este último o tipo histológico mais frequente (VIEIRA *et al.*, 2012). De acordo com a FIGO (2014), o estadiamento do câncer do corpo do útero é, na maioria das vezes, cirúrgico.

Assim como nos outros cânceres, o tratamento dessa neoplasia dependerá do estadiamento do tumor e das condições da paciente. Em grande parte dos casos é feito cirurgia seguida de radioterapia adjuvante (VIEIRA *et al.*, 2012). Dentre os tumores, o adenocarcinoma é bem diferenciado e responsivo à terapia com progesterona, sendo, assim, o de melhor prognóstico (VIEIRA *et al.*, 2012).

3.2.4 Câncer de ovário

Espera-se para 2018 uma média de 6.150 casos de câncer de ovário distribuídos por todas as faixas etárias (BRASIL, 2018). Este câncer possui como principal fator de risco o histórico familiar em parentes de primeiro grau (mãe, filha ou irmã) da doença (VIEIRA *et al.*, 2012). Em pacientes com este tipo de câncer podem ser encontradas alterações nos genes supressores *BRCA1* e *BRCA2* (KING, MARKS e MANDELL, 2003), assim como no câncer de mama citado anteriormente. Nos casos de pacientes com mutação no gene *BRCA1*, há aumento do risco de câncer de ovário. Adicionalmente ao fator genético, a nuliparidade e a infertilidade também representam fatores de risco (VIEIRA *et al.*, 2012).

Esse tipo de câncer é mais frequente em mulheres acima dos 60 anos. Assim, sintomas como aumento do volume abdominal, ascite volumosa, perda de peso e disseminação da doença pela cavidade peritoneal em idosas podem ser indício desta neoplasia. Pode aparecer, ainda, nódulo cutâneo umbilical metastático, abaulamento do fundo do saco posterior e compressão extrínseca da parede anterior do reto, dor pélvica, derrame pleural e constipação intestinal (VIEIRA *et al.*, 2012).

Segundo Vieira *et al.* (2012), o diagnóstico para o câncer de ovário é feito com base na anamnese, no exame físico e nos exames complementares. O exame clínico é realizado por USG abdominal e transvaginal que identifica lesão anexial complexa (cístico-sólida), pólipos intersticiais, cistite, implantes peritoneais, linfadenopatia intraperitoneal e derrame pleural; enquanto o aumento do fluxo sanguíneo é verificado por meio do exame Doppler. A TC do abdome e pelve também pode ser utilizada para o diagnóstico da neoplasia, relacionando-a com outros órgãos intra-abdominais. O marcador CA-125, que corresponde a uma proteína que está presente na superfície de grande parte das células cancerosas do ovário, ajuda na monitorização desta neoplasia (VIEIRA *et al.*, 2012).

Os tumores podem ser classificados como serosos (adenocarcinoma, adenocarcinoma papilífero, cistoadenocarcinoma papilífero, adenofibroma maligno), mucosos (adenocarcinoma, adenocarcinoma papilífero, cistoadenocarcinoma papilífero, adenofibroma maligno) ou tumores endometrioides malignos (denocarcinoma, adenoacantoma, adenofibroma maligno, sarcoma de estroma endometrial, tumor de células claras, tumor epitelial misto, tumor Brenner) (VIEIRA *et al.*, 2012).

O estadiamento do câncer de ovário requer a realização da laparotomia. Porém, a cirurgia para pacientes com doença extra-abdominal ainda não está estabelecida (VIEIRA *et al.*, 2012).

O tratamento para o câncer de ovário é realizado por cirurgia e o tipo de cirurgia dependerá do estadiamento do tumor. Pode-se realizar histerectomia total abdominal, salpingooforectomia bilateral, omentectomia, biopsia do peritônio pélvico e abdominal, biopsia da superfície do diafragma, lavado peritoneal para citologia oncológica, linfonodectomia pélvica e paraórtica, salpingooforectomia unilateral, biopsias múltiplas, histerectomia total com anexectomia bilateral, omentectomia juntamente com citorredução. Complementarmente, segue-se com a quimioterapia (VIEIRA *et al.*, 2012).

Nota-se que, o tratamento de todos os cânceres citados, de maneira geral, dependerá do estadiamento do tumor e das condições das pacientes, procurando-se sempre evitar tratamentos que comprometam diretamente a função reprodutiva.

3.3 Terapia anticâncer e seus efeitos colaterais

Os primórdios do tratamento contra o câncer se baseavam quase que exclusivamente em cirurgias, tendo como principal escolha a eletrocirurgia (TEIXEIRA, 2010). Até a década de 1960 a cirurgia e a radioterapia dominaram o campo da terapia do câncer. Contudo as cirurgias se tornavam mais radicais ao passo que a taxa de cura se mantinha em torno de 33% devido às micrometástases (DEVITA e CHU, 2008). O desenvolvimento da quimioterapia surgiu na busca pelo tratamento dessas micrometástases. Assim, o tratamento para a doença pode ser feito, principalmente, pela associação da cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia (MURAD e KATZ, 1996; MILLER *et al.*, 1981). Adicionalmente, pode-se utilizar também imunoterapia (GIACOMINI e MENEZES, 2012), hormonioterapia (BONASSA e SANTANA, 2005) e terapia por fotorradiação (MACHADO, 2000). Estudos pré-clínicos apontam novas possibilidades de tratamento como a terapia alvo, que inclui a utilização de fatores antiangiogênese (HEINZ, 2005). Porém este tratamento ainda não superou o fato de ocorrerem recidivas devido a mecanismos de resistência das células tumorais (BOTTSFORD-MILLER, COLEMAN e SOOD, 2012; AZAM, MEHTA E HARRIS, 2010).

A radioterapia baseia-se na utilização de radiação para destruir as células tumorais ou impedir sua proliferação (INCA, 2018). Seus efeitos colaterais consistem principalmente em xerostomia, levando à dificuldade de ingerir alimentos, e cansaço e dor nos membros (ARISAWA *et al.*, 2005). O tratamento locorregional pode afetar, ainda, a função reprodutiva.

Já os agentes quimioterápicos são compostos químicos utilizados para o tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando utilizados para o tratamento das neoplasias, são chamados de quimioterápicos antineoplásicos (INCA, 2018). Para o câncer, o tratamento quimioterápico pode variar de acordo com seu objetivo, podendo ser classificado em curativo, paliativo, adjuvante e neoadjuvante (DICKENS e AHMED, 2017; WOODLOCK e LOUGHNER, 1995).

O tratamento curativo é indicado com a finalidade de cura, enquanto o paliativo tem como objetivo o controle dos sintomas, melhorando a qualidade de vida do paciente, sem alterar a sobrevida do mesmo, podendo ser utilizado também no controle temporário da doença em casos específicos como câncer de ovário (WOODLOCK e LOUGHNER, 1995). Nestes casos, a doença pode manter-se controlada por anos, mesmo que haja recaída posterior (WOODLOCK e LOUGHNER, 1995). O tratamento adjuvante é indicado após a retirada cirúrgica completa do tumor ou após radioterapia curativa e na ausência de metástases detectáveis no intuito de eliminar os riscos das micrometástases ocultas (WOODLOCK e LOUGHNER, 1995; DICKENS e AHMED, 2017). A terapia adjuvante é, ainda, baseada em avaliação microscópica e macroscópica do tumor e seu estadiamento e leva em consideração a anamnese do paciente (DICKENS e AHMED, 2017). O tratamento neoadjuvante, por sua vez, é indicado antes da cirurgia ou radioterapia, com a finalidade de reduzir o risco de micrometástases ou promover a redução de tumores possíveis de tratamento locorregional, evitando as consequências de um pós-operatório (WOODLOCK e LOUGHNER, 1995; DICKENS e AHMED, 2017).

O grau de importância dos compostos usados na quimioterapia antineoplásica induz à necessidade da classificação sistemática a fim de facilitar a compreensão e uso de tais compostos. Os agentes quimioterápicos podem ser classificados quanto a diversos critérios não excludentes um ao outro. Um desses critérios está associado às reações adversas que podem provocar na administração

intravenosa: extravasamento de medicação (CRIADO *et al.*, 2010). Outros dois critérios referem-se à sua estrutura química e função (DICKENS e AHMED, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2005; CALABRESI e CHABNER, 2001) e à sua especificidade do ciclo celular (DICKENS e AHMED, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2005). Os dois últimos são particularmente importantes porque irão influenciar diretamente nas escolhas das drogas a serem utilizadas em determinado caso.

O INCA (2018) mantém na sua plataforma de identificação a classificação dos agentes quimioterápicos de acordo com a especificidade do ciclo celular: ciclo-específicos, ciclo-inespecíficos ou fase-específicos. Estas categorias englobam, por sua vez, grupos de agentes quimioterápicos com estruturas químicas e funções diferentes como agentes alquilantes, agentes antimetabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores mitóticos e agentes diversos.

A utilização dos quimioterápicos pode ser feita de maneira conjunta, sendo chamada de poliquimioterapia. O objetivo da poliquimioterapia é obter maior sucesso terapêutico, retardo da resistência tumoral e redução dos efeitos colaterais. Isso ocorre devido à utilização de drogas com mecanismos de ação diferentes, atuação em fases diferentes do ciclo celular e, ainda, menor dose das drogas selecionadas (BONASSA e SANTANA, 2005).

Os resultados da poliquimioterapia são os mais promissores considerando a maior taxa de cura de muitos tumores e a sobrevida dos pacientes (FONSECA, ALMEIDA e MASSUNAGA, 2000).

As possíveis combinações de drogas para o câncer de mama, colo do útero, corpo do útero e do ovário estão relacionadas na tabela 1. É importante ressaltar que cada combinação destas tem protocolos específicos de dosagem, via de administração, intervalo da aplicação e duração do tratamento.

Quadro 1. Possíveis combinações de agentes quimioterápicos no tratamento dos cânceres do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil.

Tipo de câncer	Poliquimioterapia	Referência
Câncer de mama	Adriamicina, ciclofosfamida e docetaxel;	SPARANO <i>et al.</i> , 2008
	Doxorrubicina, ciclofosfamida e docetaxel;	
	Doxorrubicina, ciclofosfamida e paclitaxel	
	Docetaxel e ciclofosfamida	JONES, <i>et al.</i> , 2006
	5-fluorouracil, doxorrubicina e ciclofosfamida	MARTIN <i>et al.</i> , 2003
Câncer do colo do útero	Cisplatina e topotecano	LONG <i>et al.</i> , 2005
	Cisplatina e paclitaxel	PICCART <i>et al.</i> , 2000
Câncer do endométrio	Carboplatina e paclitaxel	HOSKINS <i>et al.</i> , 2001
	Adriamicina e ciclofosfamida	THIGPEN <i>et al.</i> , 1994
Câncer de ovário	Cisplatina, bleomicina e etoposídeo	DIMOPOULOS <i>et al.</i> , 2004
	Carboplatina e docetaxel	MARKMAN <i>et al.</i> , 2001
	Ciclofosfamida e carboplatina	SWENERTON <i>et al.</i> , 1992

Fonte: autoria própria

Os agentes quimioterápicos não possuem especificidade em relação às células cancerosas e, da mesma forma que a radioterapia, afetam as células normais do nosso corpo (PIAZZA, URBANETZ e CARVALHO, 2011). Uma das principais características das células tumorais é sua proliferação acelerada. Algumas células normais também possuem atividade mitótica acima da média do restante, como as células da medula óssea, do tecido germinativo, do tubo digestivo e do folículo piloso (BONASSA e SANTANA, 2005). Não é coincidência, portanto, que os principais sintomas apresentados por pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico sejam náuseas e vômitos, mielotoxicidade, alopecia e mucosite (VIEIRA *et al.*, 2012).

Segundo o INCA (2018), podemos enquadrar os principais sintomas de acordo com o tempo de exposição à droga (tabela 2), evidenciando que a gravidade dos sintomas é proporcional ao tempo de tratamento necessário ao paciente.

Quadro 2: Efeitos tóxicos dos agentes quimioterápicos de acordo com o tempo de exposição à droga.

Intervalo de tempo	Sintomas
Precoces (0-3 dias)	Náuseas, vômitos, mal estar, adinamia, artralgias, agitação, exantemas, flebites.
Imediatos (7-21 dias)	Mielossupressão, mucosites, cistite hemorrágica, imunossupressão.
Tardios (meses)	Alopécia, miocardiopatia, hiperpigmentação, imunossupressão, neurotoxicidade, nefrotoxicidade.
Meses / anos (ultratardios)	Infertilidade, carcinogênese, mutagênese, distúrbio de crescimento, sequelas no sistema nervoso central.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018).

A hormonioterapia é um tipo de tratamento que se baseia na diminuição do nível de hormônios ou bloqueio da sua ação nas células tumorais. Sua utilização é limitada a tumores malignos que dependem de estímulo hormonal, como no câncer de mama, cujas células tumorais possuem receptores específicos para hormônios como os de estrógeno e progesterona (BRITO, PORTELA e VASCONCELLOS, 2014). A hormonioterapia pode ser feita de maneira paliativa a fim de evitar efeitos colaterais mais graves com uso de quimioterápicos (LEAL, CUBERO e GIGLIO, 2010). Adicionalmente também pode ser adjuvante ou neoadjuvante (MATTAR, ELLIS e HEGG, 2011). O tratamento neoadjuvante é importante em muitos casos para evitar uma possível cirurgia (mastectomia) (MATTAR, ELLIS e HEGG, 2011).

Os principais efeitos adversos podem incluir fogachos, corrimento vaginal, sangramento vaginal, tromboembólicos venosos, catarata, câncer de endométrio (OKINO SAWADA *et al.*, 2009), artralgia (MAO *et al.*, 2014), osteopenia e osteoporose (RAMASWAMY e SHAPIRO, 2003). Assim, a hormonioterapia também pode afetar a função reprodutiva nas mulheres.

3.3.1 Efeitos colaterais sobre a função reprodutiva

A infertilidade é caracterizada pela FOP. Geralmente, a FOP é o termo utilizado para descrever mulheres com idade inferior a 40 anos que apresentam interrupção da função ovariana, caracterizando-se por amenorreia, hipergonadotropismo e hipoestrogenismo, podendo coexistir ou não a depleção folicular (REBAR, 2009). Ou seja, essas mulheres podem ovular e mesmo ter filho após o diagnóstico, sendo o termo “Insuficiência Ovariana Primária”, por vezes, mais adequado ao quadro clínico (REBAR, 2009).

Essa insuficiência tem causas que variam desde fatores imunológicos (doenças autoimunes) e fatores tóxicos-ambientais (drogas quimioterápicas ou procedimentos radioterápicos-cirúrgicos) até causas genéticas (REBAR, 2009). Adicionalmente, existem as causas idiopáticas que, embora seus mecanismos desencadeadores não tenham sido caracterizados, induzem a gênese dos fenômenos de apoptose nos oócitos (MORITA, 1999).

A FOP pode ser dividida em primária e secundária. Na FOP primária, ocorrem, principalmente, por aberrações genéticas que podem ser autossômicas ou alterações no cromossomo X e a diminuição do pool de folículos primordiais (aumento da atresia devido à apoptose ou fracasso da maturação folicular) dá-se pela redução da dosagem gênica e efeitos não específicos de cromossomos, os quais prejudicam a meiose (SHELLING, 2010). A FOP secundária é a causada, dentre outros fatores, por ooforectomia bilateral, quimioterapia e radioterapia (SHELLING, 2010).

Vários estudos relatam a influência direta dos agentes quimioterápicos sobre a insuficiência ovariana, dentre eles podemos citar: testes da reserva ovariana em pacientes com câncer (SINGH, DAVIES e CHATTERJEE, 2005), insuficiência ovariana precoce em mulheres submetidas à quimioterapia contra câncer de mama (TELES *et al.*, 2009 e prevalência de amenorreia em pacientes submetidas a tratamento quimioterápico (ROSSONI *et al.*, 2010).

3.3.1.1 A reserva ovariana e sua avaliação

Os ovários dos mamíferos são constituídos por uma unidade básica estrutural e funcional denominada folículo ovariano que fornece o ambiente necessário para o crescimento e a maturação oocitária (GOSDEN *et al.*, 1993). Ele é constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais) e suas funções consistem na produção e liberação de hormônios esteroides e outros peptídeos (função endócrina) e na função exócrina ou gametogênica (GONÇALVES, FIGUEIREDO e FREITAS, 2008).

Os folículos podem ser classificados em pré-antrais (não cavitários) e antrais (cavitários). Os primeiros correspondem a cerca de 90% a 95% da população folicular e subdividem-se em primordiais, primários e secundários. Os antrais

subdividem-se em terciários e pré-ovulatórios (GONÇALVES, FIGUEIREDO e FREITAS, 2008). De forma que a reserva ovariana é definida como o *pool* de folículos ovarianos disponíveis para recrutamento, consistindo no potencial funcional do ovário através do número e da qualidade dos oócitos (CHUANG *et al.*, 2003; MAHESWARI, FOWLER e BHATTACHARYA, 2006).

A avaliação da reserva ovariana pode ser feita quando deseja-se adiar a maternidade por motivos não médicos; quando jovens são submetidas a tratamentos para neoplasias que podem acarretar perda da sua fertilidade futura, ooforectomia causada da endometriose ou de cistos, passado de doença inflamatória pélvica; dificuldade para engravidar, com idade superior a 35 anos ou histórico familiar de falência ovariana prematura (CASTRO *et al.*, 2010). O teste da reserva ovariana para ser eficaz deve ser preditivo de concepção, indicar a duração provável da atividade dos ovários, apontar a chance de se ter um recém-nascido vivo e indicar a dose ideal de estimulação ovariana MAHESHWAR, FOWLER e BHATTACHARYA, 2006).

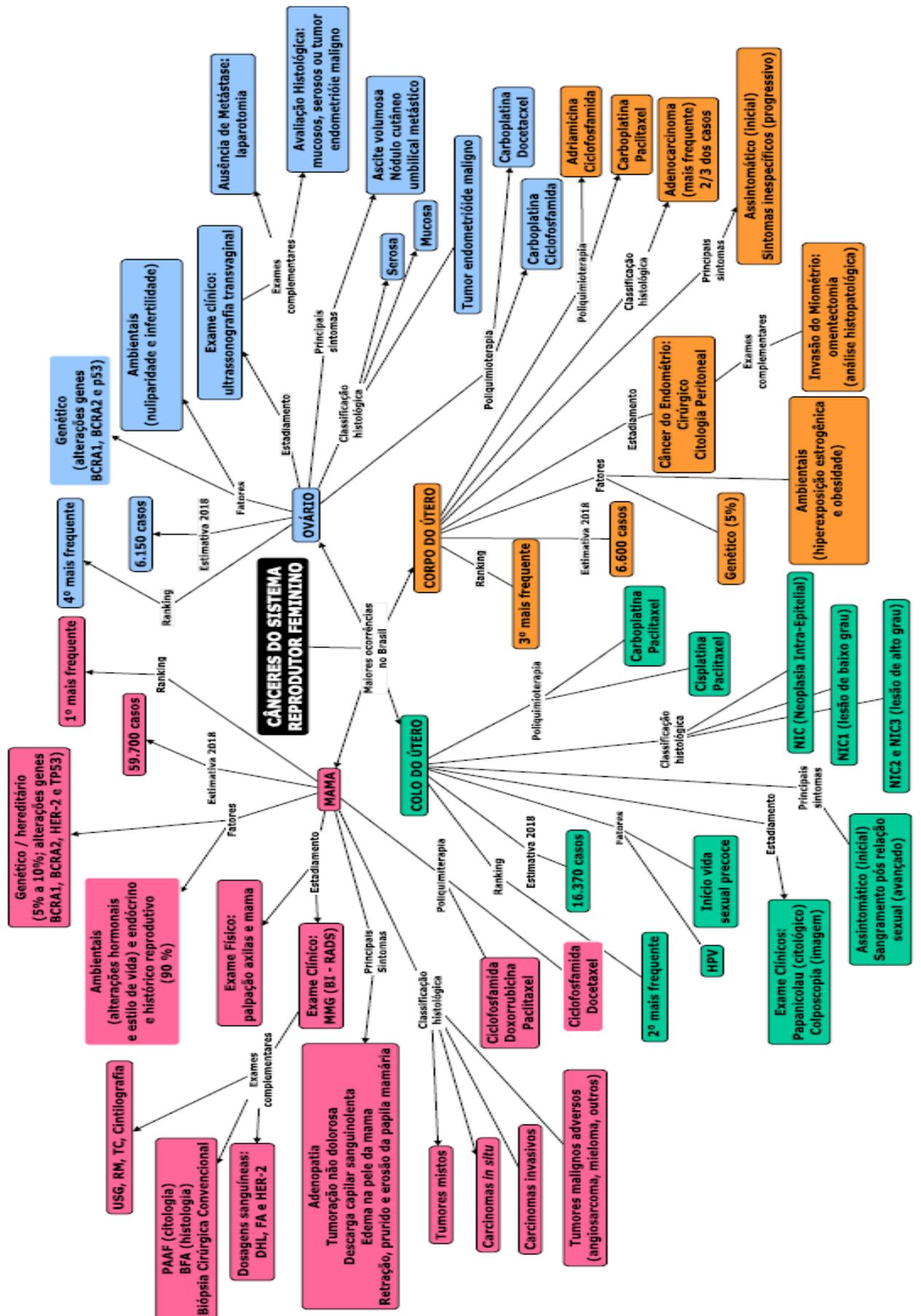
Essa avaliação é medida através de testes e marcadores de atividade ovariana, dentre os quais os mais utilizados são: dosagens hormonais, como folículo estimulante (FSH) (CHUANG *et al.*, 2003), luteinizante (LH) (WEGHOFER e FEICHTINGER, 2006), estradiol (EVERS *et al.*, 1998) e inibina-B (coletados no terceiro dia do ciclo menstrual) (de VET *et al.*, 2002), dosagem de Hormônio Anti-mulleriano (FIÇICIOGLU, *et al.*, 2006); testes provocativos ou dinâmicos, como o teste com citrato de clomifeno (TCC) (JAIN *et al.*, 2004), o teste com agonistas do GnRH (TAG) e o teste com FSH exógeno (TFE); medidas ultrassonográficas, como a contagem de folículos antrais e a medida do volume ovariano (HENDRIKS *et al.*, 2007); e a biópsia ovariana (LASS, 2004). A contagem de folículos antrais envolve a medida de folículos entre 2 e 10 mm, variando entre os centros de estudo. Considera-se que essa contagem depende do tamanho do *pool* folicular primordial do qual os folículos são recrutados. Considera-se como mínima uma contagem de dez folículos na soma dos dois ovários, para a obtenção de taxas adequadas de gestação (AVRIL, 2006; LASS, 2001).

A avaliação da reserva ovariana pode ainda ser realizada pela contagem dos folículos pré-antrais onde são observadas as alterações e degenerações celulares através de técnicas como histologia, microscopia eletrônica de transmissão (MET),

azul de Trypan, Hoescht, TUNEL e marcadores de atividade proliferativa celular (MATOS *et al.*, 2007).

Figura 1. Cânceres do sistema reprodutor feminino de maior ocorrência no Brasil: mama, colo do útero, corpo do útero e ovário. As estimativas de novos casos para 2018 são 59.700, 16.370, 6.600 e 6.150, respectivamente. As características de cada câncer são descritas na ordem: estimativa, fatores de risco, estadiamento, principais sintomas, classificação histológica e poliquimioterapia

USG: ultrassonografia; RM: ressonância magnética; TC: tomografia computadorizada; PAAF: punção aspirativa por agulha fina; BFA: biópsia de fragmento com agulha; DHL: desidrogenase láctica; FA: fosfatase alcalina; MMG: mamografia; BI-RADS: *Breast Imaging-Reporting and Data System*; HPV: papiloma vírus humano.



3.4 CONCLUSÃO

O câncer é uma patologia com mecanismos complexos e bastante heterogêneos. Mesmo com avanços nas pesquisas sobre agentes antitumorais, os dados anuais do INCA revelam que os casos de cânceres no Brasil e no mundo vêm aumentando. No caso dos cânceres do sistema reprodutor feminino, particularmente, é imprescindível o diagnóstico precoce para evitar a evolução dos tumores, com consequente perda da função reprodutiva, seja por intervenção cirúrgica seja pelos agentes quimioterápicos e radioterapia utilizados.

Os efeitos danosos das terapias anticâncer sobre a função reprodutiva das mulheres podem ocorrer direta ou indiretamente. Mesmo em tratamento de cânceres que não estão associados ao sistema reprodutor feminino, a quimioterapia, por exemplo, por atuar de forma sistêmica, causam efeitos colaterais cuja gravidade dependerá do tempo de exposição às drogas. De uma forma ou de outra, essas terapias podem causar danos irreparáveis aos ovários.

Infelizmente, até o momento ainda não existem terapias anticâncer seletivas apenas para as células tumorais. Ao longo das décadas, algumas terapias caíram em desuso enquanto outras foram sendo adotadas, sempre com objetivo de otimizar o tratamento e reduzir seus efeitos adversos. Dessa forma, é imprescindível a corrida em busca de melhorias no intuito de pôr fim ou minimizar o impacto destas terapias sobre as mulheres.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante da multiplicidade do câncer e de suas terapias, os oncologistas clínicos devem estar atualizados e sempre atentos ao surgimento de novas drogas e/ou terapias alternativas. É de se esperar que daqui a um tempo, pesquisadores consigam descrever todos os mecanismos envolvidos na patogenia desta doença e lançar terapias eficazes que permitam a preservação da fertilidade feminina, qualidade de vida e cura, sem riscos de recidivas.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/staging.html>, acessado em 18/04/2018.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem cm o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 188-129, feb. 2005.

ARISAWA, E. A. L.; SILVA, C. M. O. M.; CARDOSO, C. A. C.; LEMOS, N. R. P.; PINTO, M. C. Efeitos colaterais da terapia antitumoral em pacientes submetidos à químio e à radioterapia. **Revista de Biociências**. v. 11, n. 1-2, p. 55-61, jan-jun, 2005.

ASARE, G.A.; AFRIYIE, D.; NGALA, R.A.; ABUTIATE, H.; DOKU, D.; MAHMOOD, S.A.; RAHMAN, H. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. On the prostate, BPH-1 cells, and some target genes. *Integrative Cancer Therapy*. v. 14, n. 1, 65-74, jan 2015.

AVRIL, C. L'ovocyte: avancées fondamentales et thérapeutiques. Peut-on prédire la qualité ovocytaire par l'échographie? *Journal Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reprod*. v. 35, n. 2, p. 42-43, sept 2006.

AZAM, F.; MEHTA, S.; HARRIS, A. L. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. **The European Jorunal of Cancerology**. v. 46, n. 8, p. 1323-1323, may 2010.

BLUMENFELD, Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryo, oocytes, or ovaries. *Oncologist*, v.12, n. 9, p.1044-1054, sep 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2018. 128 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer. **Ações de enfermagem para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Pro-Onco, 240p, 1995.

BONASSA, E. M. A; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3ª ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 2005. 540p.

BRITO, C.; PORTELA, M. C.; VASCONCELLOS, M. T. L. Fatores associados à persistência à terapia hormonal em mulheres com câncer de mama. **Revista de Saúde Pública**. v. 48, n. 2, p. 284-295, 2014.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. **Quimioterapia das doenças neoplásicas**. Em: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G., editors. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutic*. 10ª ed. New York: McGraw-Hill. p. 1381-1459, 2001.

CASTRO, E. C.; FLORÊNCIO, R. S.; FILHO, G. M.; AMARAL, W. N. Folículos antrais como marcadores da reserva ovariana. *Reprodução e Climatério*. v.26, n. 1, p. 7-11. 2010.

CHUANG, C.C.; CHEN, C.D.; CHAO, K.H.; CHEN, S.U.; HO, H.N.; YANG, Y.S. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. v.1, n. 79, p. 63-68, 2003.

CRIADO, P. R.; BRANDT, H. R. C.; MOURE, E. R. D.; PEREIRA, G.L.S.; SANCHES JUNIOR, J.A. Reações tegumentares adversas relacionadas aos agentes antineoplásicos – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 599, 2010.

DE ANDREA, C. E.; SOBRAL, A. C. L.; DA COSTA, E. S. M.; TOTSUGUI, J. T.; DE ARAÚJO, S. R.; COLLAÇO, L. M. Citologia do derrame papilar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**. v. 42, n. 5, p. 333-337, out. 2006.

DE VET, A.; LAVEN, J. S. E.; DE JONG, F.H.; THEMME, A. P. N.; FAUSER, B. C. J.M. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. **Fertility and Sterility**. v. 77, n. 2, p. 357-362, feb. 2002.

De VITA, V. T.; CHU E. A history of câncer chemotherapy. **Cancer Reserch**. v. 68, n. 21, p.8643-8653, nov 2008.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Cancer treatment**. v. 36, n. 3, p. 34-38, 2017.

DIMOPOULOS, M. A.; PAPADIMITRIOU, C.; HAMILOS, G.; EFSTATHIOU, E.; VLAHOS, G.; RODOLAKIS, A.; ARAVANTINOS, G.; KALOFONOS, H.; KOUROUSSIS, C.; GIKA, D.; SKARLOS, D.; BAMIAS, A. Treatment of ovarian germ cell tumors with a 3-day bleomycin, etoposide, and cisplatin regimen: a prospective multicenter study. **Gynecologic Oncologic**. v. 95, n. 3, p. 695-700, dec 2004.

EVERS, J. L.; SLAATS, P.; LAND, J.A.; DUMOULIN, J. C.; DUNSELMAN, G. A. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**. v. 69, n. 6, p. 1010-1014, june 1998.

EZIRIM, A.; OKACHI, V.; JAMES, A.; ADEBESHI, O.; OGUNNOWO, S.; ODEGHE, O. Induction of apoptosis in myelogenous leukemic k562 cells by ethanolic leaf extract of *Annona muricata*. **Indian Journal Drug Discovery**. v. 2, n. 3, p. 142-151, march 2013.

FONSECA, S. M.; ALMEIDA, E. P. M; MASSUNAGA, V.M. **Administração dos quimioterápicos**. In: Fonseca SM, Machado RCL, Paiva DRS, Almeida EPM, Massunaga VM, Junior WR, et al. Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro (RJ). Reichmann e Affonso. 2000. p. 16-9.

FIÇICIOGLU, C.; KUTLU, T.; BAGLAM, E.; BAKACAK, Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**. v. 85, n. 3, p. 592-596, march 2006.

GIACOMINI, G; MENEZES, H. Técnicas e perspectivas em imunoterapia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 5, n. 3, p. 567-578, dez 2012.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 48, n. 6, p. 463-474, dez 2012.

GOLÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Roca, 2ªed, 2008. 395p.

GOSDEN, R.G.; BOLAND, N.I.; SPEARS, N.; MURRAY, A.A.; CHAPAMN, M.; WADE, J.C.; ZOHDY, N.I. The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. *Reproductive Medicine Review*. v.2, n. 3, p.129-152, oct. 1993.

HALL, J. M.; LEE, M. K.; NEWMAN, B.; MORROW, J. E.; ANDERSON, L. A.; HUEY, B. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**. v. 250, n. 4988, p.1684-689, dec. 1990.

HCB. **Hospital do Câncer de Barretos**. Disponível em <https://www.hcancerbarretos.com.br/quimioterapia-2/76-paciente/opcoes-de-tratamento/quimioterapia/quimioterapia-e-os-efeitos-colaterais/117-efeitos-colaterais-infertilidade>. Acessado em 15 de abril de 2018.

HENDRIKS, D. J.; KWEE, J.; MOL, B. W. J.; TE VELDE, E.R.; BROEKMANS, J.M. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. **Fertility and Sterility**. v. 87, n. 4, p. 764-775, april 2007.

HOSKINS, P.J.; SWENNERTON, K. D.; PIKE, J. A.; WONG, F.; LIM, P.; ACQUINO-PARSONS, C.; LEE, N. Paclitaxel and carboplatin, alone or with irradiation, in advanced or recurrent endometrial cancer: a phase II study. **Journal of Clinical Oncology**. v. 19, n. 20, p. 4048-53, oct 2000.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Agentes Quimioterápicos. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101, acessado em 20/04/2018.

JAIN, T.; SOULES, M.R.; COLLINS, J.A. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test of ovarian reserve screening. **Fertility and Sterility**. v. 82, n. 1, p. 180-185, july 2004.

LONG, H. J.; BUNDY, B. N.; GRENDYS JR, E. C.; BENDA, J. A.; McMEEKIN, D. S.; SOROSKY, J.; MILLER, D. S.; EATON, L. A.; FIORICA, J. V. Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**. v. 23, n. 21, p. 4626-33, jul 2005.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas** - 2a. Ed. - Ed. Plantarum - Nova Odessa - pp. 67. 2008.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MACMAHON, B. Risk factors for endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**. v. 2, n. 2, p. 122-129, aug.1974.

MAHESHWARI, A.; FOWLER, P.; BHATTACHARYA, S. Assessment of ovarian reserve-should we perform tests of ovarian reserve routinely? **Human Reproduction**. v.21, n. 11, p. 2729-2735, aug. 2006.

MARKMAN, M.; KENNEDY, A.; WEBSTER, K.; PETERSON, G.; KULP, B.; BELINSON, J. Combination chemotherapy with carboplatin and docetaxel in the treatment of cancers of the ovary and fallopian tube and primary carcinoma of the peritoneum. **Journal of Clinical Oncology**. v. 19, n. 7, p. 1901-1905, apr 2001.

MAO, J. J. XIE, S. X.; FARRAR, J. T.; STRICKER, C. T.; BOWMAN, M. A.; BRUNER, D.; DeMICHELE, A. A randomized trial of electro-acupuncture for arthralgia related to aromatase inhibitor use. **European Journal of Cancer**. v. 50, n. 1, p. 267-276. 2014

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, n.4, p.433-442, dez. 2007

MILLER, A. B.; HOOGSTRATEN, B.; STAQUET, M.; WINKLER, A. Reporting results of cancer treatment. **Cancer**. v. 47, n. 1, p. 207-214, jan 1981.

MATTAR, A.; ELLIS, M.; HEGG, R. Hormonioterapia neoadjuvante no câncer de mama. **Revista Brasileira de Medicina** v.1, n. 1, p. 201-207, nov 2011.

MIKI, Y.; SWENSEN. J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P. A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S. A strong candidate for the BRCA and breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**. v. 266, n. 5182, p. 66-71, oct. 1994.

MINARI, J.; 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. 327-334, oct. 2014.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**. v. 213, n. 1, p.1-17, sept. 1999.

MURAD, A.M.; KATZ, A. **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**. Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41. 1996.

MUKHERJEE, S. O imperador de todos os males: uma biografia do câncer. Companhia das Letras. 2012. 640 p.

OKTAY, K.; SONMEZER, M.; OKTEM, O.; FOX, K.; EMONS, G.; BANG, H. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone

analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. **The Oncologist**, v.12, p.1055-1066, July 2007.

PIAZZA, M. J.; URBANETZ, A. A.; CARVALHO, N. S. O impacto da radioterapia e da quimioterapia no aparelho genital feminino. **Femina**. v. 39, n. 3, mar 2011.

PICCART, M. J.; BERTELSEN, K.; JAMES, K.; CASSIDY, C. M.; SIMONSEN, G. S.; KAYE, STAN.; VERGOTE, I.; GRIMSHAW, R. B. R.; ATKINSON, R. J.; SWENERTON, K. D.; TROPE, C.; NARDI, M.; KAERN, J.; TUMOLO, S.; TIMMERS, P.; ROY, J. A.; LHOAS, F.; LINDVALL, B.; BACON, M.; BIRT, A.; ANDERSEN, J. E.; ZEE, B.; PAUL, J.; BARON, B.; PECORELLI, S. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 92, n. 9, p. 699-708, May 2000.

PINHO, A. A.; MATTOS, M. C. F. I. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas de colo de útero. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 38, n. 3, p. 225-231, abr 2002.

PINTO, A. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 48, n. 1, p. 73-78, 2002.

RAMA, C.; MARTINS, C. R.; DERCHAIN, S.; LONGATTO FILHO, A.; GONTIJO, R.; SARIAN, L.; SYRJANEN, K.; CHING, T.; ALDRIGHI, J. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Revista de Saúde Pública**. v. 42, n. 3, p. 411-419, Jun. 2008.

RAMASWAMY e SHAPIRO, C. L. Osteopenia and Osteoporosis in Women with Breast Cancer. **Seminars in Oncology**. v. 30, n. 6, p. 763-775. 2003.

REBAR, R.W. Premature ovarian failure. **Obstetric and Gynecology**. v.113, n. 6, p. 1355-1363, June 2009.

REMERS, W. A. **Antineoplastic agents**. In: DELGADO, J. N.; REMERS, W. A (ed.) Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 12, p. 343, 1998.

SBC. **Sociedade Brasileira do Câncer**. Disponível em <http://www.sbcancer.org.br/alguns-numeros-do-cancer-no-brasil-e-no-mundo/>. Acessado em 15 de abril de 2018.

ROSSONI, C.; BIANCO, B.; RIZZO, M. D. F. V.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARBOSA, C. P. Prevalência de amenorreia em pacientes submetidas a tratamento quimioterápico. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica** v. 8, n. 6, p. 469-472, 2010.

SHELLING, A.N. Premature ovarian failure. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**. v. 140, n. 5, p. 633-641, Aug. 2010.

SILVA, C. R. L.; SILVA, R. C. L.; VIANA, D. L. **Compacto Dicionário Ilustrado de Saúde**. 2. ed. São Caetano do Sul: Yendis, 2010.

SINGH, R. K.; KUMAR, S.; PRASAD, D. N.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: historic to future perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.151, p. 401-433. apr. 2018.

SINGH, K. L.; DAVIES, M.; CHATTERJEE, R. Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing. **Human Reproduction Update**. v. 11, n. 1, p. 69-89, 2005.

SPARANO, J. A.; WANG, M.; MARTINO, S.; JONES, V.; PEREZ, E. A.; SAPHNER, T.; WOLFF, A. C.; SLEDGE JR., G. W.; WOOD, W. C.; DAVIDSON, N. E. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 358, n. 16, p. 1663-71, apr 2008.

SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H.; SUM, X.; ZHOU, K. Three new anti-proliferative annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, n. 1, p. 2773–2776, 2014.

TAVTIGIAN, S. V.; SIMARD, J.; ROMMENS, J.; COUCH, F.; SHATTUCK- EIDENS, D.; NEUHAUSEN, S. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nature Genetics**. v. 12, p. 333-337, march 1996.

THOMPSON, A. M. p53 and breast cancer. **The breast**. v. 2, n. 1, p. 8-10, march 1993.

VIEIRA, S C et al. **Oncologia Básica**. Teresina: Fundação Quixote, 1ª ed., 324 p., 2012.

WALBOOMERS, J. M. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**. v.189, p. 12-9, 1999.

WEGHOFER, A.; FEICHTINGER, W. The forgotten variable: impact of luteinizing hormone on the prediction of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**. v. 85, n. 1, p. 259-261, jan. 2006.

WU; Y.C. Cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. U.S. Patent Application 31/07/2003, Protocolo nº 2003144348-A1.2001.

WOODLOCK, T. J.; LOUGHNER, J.E. **Farmacologia clínica dos agentes antineoplásicos**. In: Rosenthal S, Carignan JR, Smith BD. *Oncologia prática: cuidados com o paciente*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 41-64, 1995.

WOOSTER, R.; BIGNELL, G., LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**. v. 378, n. 6559, p. 789-792, dec. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 2007.

YAMADA, A. M.; MELO, A. L. K. O.; LOPES, G. P.; DE ANDRADE NETO G. B.; MONTEIRO, V. B.; SOARES, R. S. Edema bilateral das mamas secundário a obstrução da veia cava superior e trombose de veia subclávia. **Radiologia Brasileira**. v. 4, n. 46, p. 252-254, jul. 2013.

4 CAPÍTULO 2

PRODUTOS NATURAIS NA QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER

4.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são definidas como as plantas cuja sua totalidade ou seus componentes são utilizados como medicamentos fitoterápicos, de forma que, medicamento fitoterápico é todo aquele do qual se utilizam apenas matérias-primas vegetais (BRASIL, 2004a).

A utilização de plantas medicinais é muito difundida no mundo e, principalmente, em países da América do Sul, e contribui para os cuidados com a saúde como no tratamento de doenças primárias (HOLETZ *et al.*, 2002). No Brasil, estas plantas são utilizadas sob forma de extratos brutos, infusões ou emplastos para tratar infecções sem evidências científicas de eficácia (HOLETZ *et al.*, 2002).

Nota-se que há necessidade de estudos sobre os princípios ativos das mais diversas plantas consumidas. Esses princípios ativos, dentro de uma mesma planta, podem variar de acordo com as condições da planta na natureza: como idade, estação da colheita, tipo de solo, suas partes (folhas, raiz, caule, sementes ou fruto) e, ainda, do modo de extração (BRASIL, 2004b). Neste último caso, de maneira resumida, são utilizados solventes polares como etanol, metanol ou água para extração de metabólitos polares e clorofórmio e hexano para extração de compostos mais lipofílicos (DUNN e ELLIS, 2005). Conseqüentemente, a escolha dos reagentes corretos otimiza a extração do metabólito a ser analisado (DUNN e ELLIS, 2005).

Portanto, é de suma importância uma investigação do potencial medicamentoso das plantas medicinais para corroborar seus efeitos terapêuticos e, possivelmente, proceder com a produção de fármacos mais baratos e com menos efeitos colaterais para os pacientes.

Entre as plantas medicinais bastante difundidas no Brasil, está a graviola, *Annona muricata*, da família Annonaceae, conhecida por seu uso etnomédico extensivo tradicional, cujo interesse dos pesquisadores vem aumentando na tentativa de isolar fito-constituintes e elucidar suas ações farmacológicas (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014).

4.2 *Annona muricata* L: uso etnomédico e fitoquímica

A *Annona muricata* L é uma planta da família Annonaceae e gênero Annona, amplamente distribuída na América Central e do Sul.

Figura 01. Folhas, frutos e sementes de *Annona muricata*



Fonte: http://www.tramil.net/fototeca/imageDisplay.php?id_elem=36&famil=ANNONACEE

4.2.1 Uso etnomédico e atividade biológica

A graviola é amplamente utilizada como medicamento tradicional pela população de países em desenvolvimento (BARATA *et al.*, 2009).

Todas as suas partes são utilizadas para finalidades específicas. A raiz da planta é usada como vermífugo (MORTON, 1987). Suas cascas utilizadas como espamolíticas e contra o diabetes (LORENZI; MATOS, 2002). A fruta pode ser utilizada para fins nutricionais, como alimento diurético, no caso do suco, e, ainda, quando imaturo, serve para disenteria (BARATA *et al.*, 2009). As flores e as folhas dessa planta são utilizadas contra tosse e problemas no trato respiratório inferior (MORS, RIZZINI e PEREIRA, 2000). As sementes e as folhas são utilizadas como adstringente e emética (LORENZI; MATOS, 2002; DE CARVALHO, DOS SANTOS e SANT'ANA, 2000). As folhas são utilizadas, ainda, por sua ação antiparasitária, antirreumática e antinevrálgica (DE CARVALHO, DOS SANTOS e SANT'ANA, 2000); como sedativo, expectorante e broncodilatador (QUEIROZ *et al.*, 1988); como emagrecedor e antineoplásico em alguns tipos de câncer (BARATA *et al.*, 2009).

Um dos principais motivos que chama a atenção para esta planta nas últimas décadas é seu potencial anticancerígeno. Na América do Sul e na África, ela é amplamente utilizada pela população contra tumores e cânceres diversos (ADEWOLE e OJEWOLE, 2009). A atividade anticancerígena de *A. muricata* já foi estudada em células cancerosas da próstata BPH-1 (ASARE *et al.*, 2015); quimiopreventiva na proliferação das células do tecido mamário (MINARI e OKEKE, 2014); toxicidade contra células cancerosas do colón, linhagem HT-29 (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014a; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015a) e linhagem HCT-116 (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014a); toxicidade contra células cancerosas do pulmão, linhagem A549 (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014b); estabilização da metástase no câncer de mama (HANSRA, SILVA e MEHTA, 2014); toxicidade contra células k562 da leucemia mieloide crônica (EZIRIM *et al.*, 2013); diminuição da tumorigenicidade e metástase de tumores pancreáticos (TORRES *et al.*, 2012); toxicidade contra linhagens celulares do hepatoma humano Hep G2 e Hep 2, 2, 15 (LIAW *et al.*, 2002); e toxicidade contra células cancerosas do pâncreas, linhagem MIA PaCa-2 (ZENG *et al.*, 1996).

4.2.2 Fitoquímica

De acordo com a revisão feita por Moghadamtousi e colaboradores (2015b), diferentes partes da graviola (folhas, sementes, frutos e casca) foram avaliadas fitoquimicamente, constatando-se a presença de alcaloides, megastigmanos, triglicosídeos de flavonol, fenólicos, ciclopéptideos, óleos essenciais e acetogeninas annonaceous. E, da mesma forma, estes fitoconstituintes foram associados às suas respectivas atividades biológicas.

No quadro a seguir são discriminados alguns dos fito-constituintes de *A. muricata* com atividade anticancerígena já comprovada, agrupados de acordo com a parte da planta do qual foram extraídos.

Quadro 01. Compostos químicos com atividade anticancerígena isolados de *A. muricata*.

Parte da planta	Fito-constituente	Classe	Atividade biológica
Folhas	Annomuricina A, B e C Muricatocina C	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pulmão A549, mama MCF-7 e colon HT-29
Folhas	Annomuricina E e muricapentocina	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pâncreas MIA PaCa-2 e do colon HT-29
Folhas	Annomutacina, (2,4- <i>cis</i>)-10 <i>R</i> -annonacina-A-um e (2,4- <i>trans</i>)-10 <i>R</i> -annonacina-A-um	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pulmão A549
Folhas	Annohexocina	AGE	Toxicidade contra diferentes células cancerosas
Folhas	Muricatocina A e B	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pulmão A549
Folhas	Annopentocina A	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pâncreas MIA PaCa-2
Folhas	Annopentocina B e C	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pulmão A549
Folhas	<i>Cis</i> -annonuricina-D-um e <i>trans</i> -annonuricina-D-um	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pulmão A549, colon HT-29 e pâncreas MIA PaCa-2
Folhas	Murihexocina A, B e C Muricoreacina Cis-corossolona Annocatalina Annocatacina B	AGE	Toxicidade contra diferentes células cancerosas
Frutos	Muricina J, K e L	AGE	Toxicidade contra células do câncer de próstata PC-3
Sementes	Muricatacina	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do pulmão A549, mama MCF7 e cólon HT-29
Sementes	Muricina A, B, C, D, E, F, G, H e I Cis-annomontacina Annocatacina A	AGE	Toxicidade contra células do hepatoma humano
Sementes	Cis-annonacina Cis-annonacina-10-um Cis-goniotalamicina Arianacina Javoricina	AGE	Inibição do tumor da vesícula coronária, células cancerosas do pulmão A549, mama MCF-7 e cólon HT-29
Sementes	Gigantetrocina B	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do cólon HT-29
Sementes	Corossolina	AGE	Toxicidade contra células cancerosas oral KB
Sementes e folhas	Gigantetrocina A Muricatetrocina A e B	AGE	Toxicidade contra células cancerosas do cólon HT-29
Sementes, folhas e pericarpo	Annonacina	AGE	Inibidor do complexo I mitocondrial
Sementes e folhas	Corossolona	AGE	Toxicidade contra células cancerosas oral KB
Sementes, raízes e folhas	Solamina	AGE	Toxicidade contra células cancerosas oral KB

AGE: acetogenina anonácea. Fonte: MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015b.

Neste sentido, fica em aberto, um espectro de possibilidades para a ação anticancerígena da graviola, uma vez que sua análise fitoquímica mostrou uma variedade imensa de metabólitos primários e secundários (LORENZI e MATOS, 2008). Devido a estas evidências, a graviola (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015) tem grande procura no mercado por laboratórios de pesquisa e de produção de fitoterápicos. Concomitantemente, o amplo emprego desta planta pela medicina popular, com resultados positivos, e sua grande biodisponibilidade no Brasil estimulam estudos químicos, farmacológicos e clínicos mais direcionados, buscando validar o extrato de *A. muricata* como medicamento antitumoral (LORENZI e MATOS, 2008). No entanto, a ampla abordagem científica com essa planta, está focada basicamente nos seus efeitos benéficos, limitando os estudos sobre os efeitos adversos que podem ocorrer na utilização do seu extrato bruto ou componentes individuais, como por exemplo a gonadotoxicidade que afeta drasticamente mulheres em idade reprodutiva.

REFERÊNCIAS

ADEWOLE, S.; OJEWOLE, J. Protective effects of *Annona muricata* linn.(annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal Traditional Complementary and Alternative Medicines**. v. 6, n. 3, p. 30-41, oct. 2008.

ASARE, G.A.; AFRIYIE, D.; NGALA, R.A.; ABUTIATE, H.; DOKU, D.; MAHMOOD, S.A.; RAHMAN, H. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. On the prostate, BPH-1 cells, and some target genes. **Integrative Cancer Therapy**. v. 14, n. 1, 65-74, jan 2015.

BARATA, L. E. S.; ALENCAR, A. A. J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. Plantas Medicinais Brasileiras IV. *Annona muricata* L. (graviola). **Revista Fitos**. v. 4, n.1, p. 132-138, março 2009.

BRASIL 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 90 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

DE CARVALHO, J.M.; DOS SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E.G. Estudo da atividade moluscicida da *Annona muricata*. XXIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas, **Anais do Congresso, QB-028**, 2000.

DUN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in analytical chemistry**. v. 24, n. 4, p. 285-294, april 2005.

EZIRIM, A.; OKACHI, V.; JAMES, A.; ADEBESHI, O.; OGUNNOWO, S.; ODEGHE, O. Induction of apoptosis in myelogenous leukemic k562 cells by ethanolic leaf extract of *Annona muricata*. **Indian Journal Drug Discovery**. v. 2, n. 3, p. 142-151, march 2013.

HANSRA, D.M.; SILVA, O.; MEHTA, A.; AHN, E. Patient with metastatic breast cancer achieves stable disease for 5 years on graviola and xeloda after progressing on multiple lines of therapy. **Advances in Breast Cancer Research**. v. 3, n. 3, p. 84-87, july 2014.

HOLETZ, P. B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 7, p. 1027-1031, oct. 2002.

LIAW, C.C.; CHANG, F.-R.; LIN, C.-Y.; CHOU, C.-J.; CHIU, H.-F.; WU, M.-J.; WU, Y.-C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 65, n. 4, p. 470475, march 2002.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas - 2a. Ed.** - Ed. Plantarum - Nova Odessa - pp. 67. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil Nativas e Exóticas**. Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Nova Odessa, p.60-61, 2002.

MANICA, I. **Taxonomia, morfologia e anatomia**. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. Anonáceas: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. p. 20-35. 1997.

MINARI, J.; 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. 327-334, oct. 2014.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; ROUHOLLHI, E.; ARIMIAN, H.; FADAEINASAB, M.; FIROOZINIA, M.; ABDULLA, M.A.; KADIR, H.A. The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of acetogenin annomuricin E in HT-29 cells: A bioassay-guided approach. *Plos one*. v. 10. n. 4, p. 1-28, april 2015a.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses,

isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 7, p. 15625-15658, July 2015b

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; KADIR, H.A.; PAYDAR, M.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- κ B. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 14, n. 299, Aug. 2014a.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H.; FADAEINASAB, M.; ABDULLA, M.A.; KADIR, H.A. Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. **Drug Design Development and Therapy**. v. 8, p. 2099-2111, Oct. 2014b.

MORS, B.W.; RIZZINI, T.C.; PEREIRA, A.N. **Medicinal plants of Brazil**. Defilippis, R. A. Ed. References Publications, Inc., p.13, 2000.

MORTON, J.S. In: **Fruits of warm climates**. Ed. Julia F. Morton, Miami, FL, p.75-80, 1987.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, PAUL, J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**. v. 18, n. 2, p. 281-293, June 2004.

QUEIROZ, N.A.; ALESSI, A.C.; SANT'ANA, A.E.; ZAMBIANCHI, A.R. Avaliação toxicológica do chá de graviola. 1988. X SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, São Paulo, **Anais do Congresso**, 5/P52, 1988.

TORRES, M. P.; RACHAGANI, S.; PUROHIT, V.; PANDEY, P.; JOSHI, S.; MOORE, E. D.; JOHANSSON, L.; SINGH, P. K.; GANTI, A. K.; BATRA, S. K. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. **Cancer Letters**. v. 323, n. 1, p. 29-40, Oct 2012.

5 CAPÍTULO 3

IMPACTO MORFOPATOLÓGICO DO EXTRATO DE FOLHAS DE GRAVIOLA (*Annona muricata* L) NA RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

IMPACTO MORFOPATOLÓGICO DO EXTRATO DE FOLHAS DE GRAVIOLA (*Annona muricata* L) NA RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

Samira da S. Maciel¹, Dandara M. S. Araújo², Izabel P. da Silva², Luciana R. Faustino²

¹ Campus Amílcar Ferreira Sobral, Universidade Federal do Piauí, Floriano, PI, Brasil; ² Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil.

RESUMO

A *Annona muricata* (graviola) tem se destacado por sua elevada atividade citotóxica e especificidade em relação às células tumorais, sendo necessários estudos sobre o impacto desse quimioterápico natural sobre a reserva ovariana e, conseqüentemente, sobre a fertilidade feminina. Este estudo investigou o efeito morfológico do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* sobre a reserva ovariana de camundongos fêmeas. Inicialmente, o extrato etanólico das folhas de *A. muricata* foi analisado por fitoquímica qualitativa, espectrofotometria UV-vis e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para confirmar presença de ativos antes da administração nos animais. Para a parte experimental, foram utilizados 24 camundongos fêmeas da linhagem Swiss, com idade entre 2 a 3 meses, os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de acordo com a substância administrada: I - solução salina 0,9% (veículo), II - ciclofosfamida (75 mg/kg), III - extrato da folha de graviola (50 mg/kg) e IV - extrato da folha de graviola (100 mg/kg). Ao final, os animais foram eutanasiados e seus ovários, baço, coração, estômago, fígado, pulmões, rins e útero foram coletados e analisados quanto à sua morfologia. Para a análise histológica dos ovários foi observado o número de folículos, a morfologia folicular e a densidade das células do estroma ovariano. Em adição, foi realizada a análise anatomopatológica dos diferentes órgãos coletados. Para a análise estatística, os resultados foram expressos como média e frequência absoluta, considerando $p < 0,05$. Os ensaios de caracterização do extrato revelaram presença de ácidos orgânicos, flavonoides, alcaloides e esteroides, com confirmação de subclasses dos flavonoides por espectrofotometria UV-vis e CLAE. Segundo as inferências estatísticas, os grupos tratados com o extrato não mostraram morte folicular ou diminuição da densidade das células do estroma em relação ao veículo, enquanto o grupo tratado com a ciclofosfamida mostrou maior número de morte folicular ($p < 0,05$) em relação ao mesmo. Adicionalmente, a análise anatomopatológica dos órgãos dos animais tratados com o extrato 50 mg/kg não apresentou alterações distinguíveis em relação ao veículo. Em contrapartida, os grupos do extrato 100 mg/kg e da ciclofosfamida apresentaram alterações no fígado. Dessa forma, o estudo mostrou que o extrato etanólico de folhas de graviola não reduziu a reserva ovariana de camundongos fêmeas em ambas as concentrações, não sendo tóxico ao ovário de acordo com os parâmetros utilizados e, ainda, que a dose de 50 mg/kg é a de melhor escolha para estudos posteriores.

Palavras-chave: Quimioterápicos. Fertilidade. Reserva ovariana.

ABSTRACT

Annona muricata (graviola) has been noted for its high cytotoxic activity and specificity in relation to tumor cells, requiring studies on the impact of this natural chemotherapeutic on the ovarian reserve and, consequently, on female fertility. This study investigated the effect of the ethanolic extract of *A. muricata* leaves on the preservation of the ovarian reserve of female mice. Initially, the ethanolic extract of *A. muricata* leaves was analyzed by qualitative phytochemistry, UV-vis spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC) to confirm the presence of active substances prior to administration to the animals. Twenty four female Swiss mice, aged 2 to 3 months, were randomly divided into four experimental groups according to the administered substance: I - saline solution 0.9% (vehicle), II - cyclophosphamide (75 mg / kg), III - soursoup leaf extract (50 mg / kg) and IV - soursop leaf extract (100 mg / kg). At the end, the animals were euthanized and their ovaries and spleen, heart, stomach, liver, lungs, kidneys and uterus were collected and analyzed for their morphology. The histological analysis of one ovary of each animal was performed through the evaluation of the follicle number, follicular morphology and ovarian stromal cell density. Finally, the anatomopathological analysis of the different organs collected was performed. For the statistical analysis, the results were expressed as median, considering $p < 0.05$. The characterization of the extract showed the presence of organic acids, flavonoids, alkaloids and steroids, with confirmation of subclasses of flavonoids by UV-vis spectrophotometry and HPLC. For the histological analysis of the ovaries, the follicular number, the follicular morphology and the density of ovarian stromal cells were observed. In addition, the anatomopathological analysis of the different organs collected was performed. For the statistical analysis, the results were expressed as mean and absolute frequency, considering $p < 0.05$. The characterization of the extract showed the presence of organic acids, flavonoids, alkaloids and steroids, with confirmation of subclasses of flavonoids by UV-vis spectrophotometry and HPLC. According to statistical inferences the groups treated with the extract did not show follicular death or decreased stromal cell density in relation to the vehicle, while the cyclophosphamide treated group showed a higher number of follicular death ($p < 0.05$). In addition, anatomopathological analysis of the organs treated with the concentration 50 mg/kg of the extract did not show any distinguishable changes in relation to the vehicle. Thus, the study showed that the ethanolic extract of graviola leaves preserved the ovarian reserve of female mice, not being toxic to the ovary. In addition, anatomopathological analysis of the organs of the animals treated with the 50 mg / kg extract did not show any distinguishable changes in relation to the vehicle. In contrast, the 100 mg / kg extract and cyclophosphamide groups showed alterations in the liver. Thus, the study showed that the ethanolic extract of soursoup leaves did not reduce the ovarian reserve of female mice at both concentrations and was not toxic to the ovary according to the parameters used, and also that the dose of 50 mg / kg is the one of better choice for further studies.

Key-words: Chemotherapeutics. Fertility. Ovarian reserve.

5.1 INTRODUÇÃO

A utilização dos quimioterápicos vigentes para o tratamento do câncer ainda traz consigo muitos efeitos colaterais. Dentre estes efeitos está a disfunção reprodutiva, que pode ser irreversível (LONGO, 2014). Nas mulheres, esta disfunção reprodutiva pode resultar da falência ovariana prematura (FOP), definida como a diminuição do *pool* dos folículos ovarianos disponíveis para recrutamento, com redução da quantidade e da qualidade dos gametas femininos (MEIROW *et al.*, 2010; MALTARIS *et al.*, 2007; ANDERSON *et al.*, 2006; MEIROW e NUGENT, 2001).

Devido aos efeitos indesejáveis dos quimioterápicos, busca-se o desenvolvimento de novas substâncias à base de produtos naturais que tenham atividade antitumoral eminente e, ao mesmo tempo, não causem efeitos colaterais. Dessa forma, o estudo de extratos ou bioativos de plantas a serem testados como antitumorais, sobretudo em mulheres em idade reprodutiva, deve também ter como foco suas respostas gonadotóxicas como forma de contornar a FOP e, conseqüentemente, desenvolver tratamentos especificamente desenhados para prevenir a infertilidade feminina.

Dentre as plantas medicinais amplamente estudadas, a *Annona muricata*, conhecida popularmente como graviola, pertencente à família Annonaceae, é bastante conhecida por seu extensivo uso etnomédico tradicional (LORENZI e MATOS, 2008). A utilização das suas folhas já foi descrita por ter propriedades adstringente e emética (LORENZI; MATOS, 2002; DE CARVALHO, DOS SANTOS e SANT'ANA, 2000); ação antiparasitária, antirreumática e antinevrálgica (DE CARVALHO, DOS SANTOS e SANT'ANA, 2000); ação sedativa, expectorante e broncodilatadora (QUEIROZ *et al.*, 1988); e, ainda, com ação antineoplásica em alguns tipos de câncer (BARATA *et al.*, 2009).

Estudos anteriores relataram que a graviola apresentou toxicidade contra células cancerosas da mama, linhagem MCF7 (NAJMUDDIN *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2014) e linhagens MDA-MB-231 e 4 T1 (NAJMUDDIN *et al.*, 2016) ; contra células do câncer de próstata (ASARE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2003; LIAW *et al.*, 2002), contra células cancerosas do colón, linhagem HT-29 (SUN *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 1998), contra células cancerosas do pulmão, linhagem A549 (SUN

et al., 2014; WU *et al.*, 1995); contra células cancerosas do pâncreas, linhagem MIA PaCa-2 (KIM *et al.*, 1998; ZENG *et al.*, 1996); contra células do hepatoma humano (RIESER *et al.*, 1991); contra células cancerosas oral KB (VILA-NOVA *et al.*, 2013; VILA-NOVA *et al.*, 2011; LIAW *et al.*, 2002; CORTES *et al.*, 1991) e atividade quimiopreventiva na proliferação de células do tecido mamário (MINARI e OKEKE, 2014).

Aliado ao seu elevado potencial citotóxico, a graviola, ao contrário dos quimioterápicos convencionais, possui especificidade em relação às células tumorais (BARATA *et al.*, 2009). Contudo, segundo nosso conhecimento, ainda não há estudos sobre o impacto desse quimioterápico natural sobre a reserva ovariana e, conseqüentemente, sobre a FOP. Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar o impacto do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* sobre a reserva ovariana de camundongos fêmeas.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Origem dos animais e grupos experimentais

Camundongos fêmeas (*Mus musculus*) (n=24), da linhagem Swiss, com idade entre 2 a 3 meses, foram obtidas do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) após aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), protocolo 22116. Os animais foram alimentados com ração apropriada e água *ad libitum*, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h à temperatura de 22 °C (\pm 2), em gaiolas de polipropileno forradas com xilana e seu manejo durante as práticas experimentais seguiu o preconizado pela legislação brasileira (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA 2016).

O estudo totalizou quatro grupos experimentais e o delineamento experimental é ilustrado na figura 1. As fêmeas, aleatoriamente destinadas para os grupos experimentais (n=6 animais/grupo), foram pesadas no primeiro dia, antes da administração das substâncias, e ao final do experimento (oitavo dia).

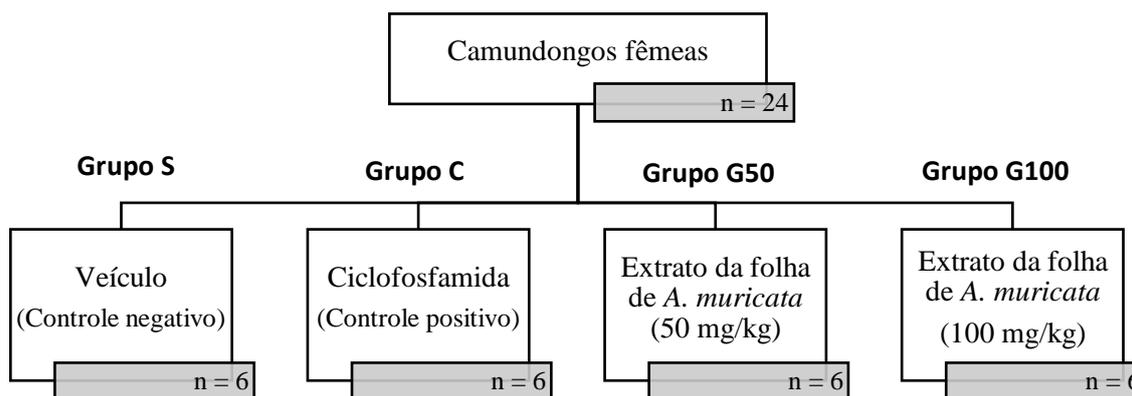


Figura 01. Desenho esquemático evidenciando os quatro grupos experimentais.
Fonte: Autoria própria.

A administração do veículo (0,1 ml de solução salina 0,9% - Grupo S) e do quimioterápico ciclofosfamida (75 mg/kg em solução salina 0,9% - Grupo C) foi realizada de maneira asséptica, através de duas doses intraperitoneal (primeiro e quarto dia), na região abdominal inferior próxima da base da perna posterior esquerda. Enquanto, o extrato de folha de *A. muricata* (50 e 100 mg/kg em solução salina 0,9% - G50 e G100, respectivamente) foi administrado intragastricamente por gavagem, durante sete dias consecutivos.

5.2.2 Obtenção e extração do material vegetal

Os galhos de graviola foram coletados na comunidade Lagoa da Prata, município Parnaíba – PI (2°57'38"S 41°47'26"W). Logo após a coleta, a fitotaxonomia para *A. muricata* foi realizada no Herbário do Departamento de Biologia, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí. As folhas foram lavadas em água corrente e escurridas para pesagem (498 g). Em seguida, as folhas foram destinadas à estufa a 45°C para secagem por 72 h. As folhas foram trituradas em um moinho de facas e o pó obtido foi resfriado à temperatura ambiente e pesado novamente para o cálculo do rendimento (159,36 g). Posteriormente, foi realizada maceração exaustiva com etanol 95°C [proporção 1:10 (p:v)] com agitação ocasional durante três dias. Passado esse período, a suspensão foi filtrada com papel filtro e o filtrado foi reservado. O procedimento foi repetido três vezes até descoloração completa da mistura e o filtrado final foi destinado a um rotaevaporador a 40°C, 60 rpm, inicialmente a 175 mbar com diminuição gradativa até 60 mbar até

máxima evaporação (PIEME *et al.*, 2014). Em seguida, o extrato etanólico obtido foi diluído em solução salina 0,9% em diferentes doses (50 e 100 mg/kg) e reservado para posterior análise e administração. O cálculo de rendimento do extrato etanólico foi realizado com base na matéria seca da amostra coletada e no peso do extrato obtido. A fórmula utilizada para o cálculo do rendimento foi:

$$R (\%) = (ME \div MF) \times 100$$

Onde:

R = Rendimento do extrato etanólico;

ME = Massa do extrato etanólico (g);

MF = Massa das folhas secas de graviola (g).

5.2.3 Caracterização dos extratos

5.2.3.1 Prospecção fitoquímica

A análise fitoquímica qualitativa foi realizada utilizando a metodologia de BARBOSA *et. al.* (2001) na qual foram investigadas as seguintes classes metabólicas: saponinas (saponina espumídica), ácidos orgânicos, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, flavonoides por classes, alcaloides, purinas, esteroides e triterpenoides. A massa do extrato utilizada para os testes foi padronizada em 20 mg.

5.2.3.2 Espectrofotometria UV-vis

Os extratos e frações foram analisados no UV-1800 Shimadzu (software UV-probe 2.33) com comprimento de onda na faixa 190 nm – 1100 nm. As concentrações testadas foram 3 mg extrato / 1 mL etanol 95%; 1,5 mg extrato / 1 mL etanol 95%; 0,75 mg extrato / 1 mL etanol 95%; e 0,187 mg extrato / 1 mL etanol 95%. Os resultados dos espectros de absorvância das amostras determinaram os comprimentos de onda a serem analisados na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5.2.3.3 CLAE

Para a CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão – modelo SPD-20A), a amostra foi tratada com metanol em um extrator de fase sólida para retirada da clorofila. A solução obtida foi evaporada no centrivap Concentrator Plus Eppendorf. A amostra do extrato foi preparada utilizando-se 3 mg do extrato bruto em 1 mL de metanol grau CLAE e essa solução foi filtrada em filtro de seringa PES de 0,45 µm. Ao final, 10 µL foram injetados.

As condições cromatográficas para análise dos extratos brutos foram: coluna phenomenex Luna C18 250 mm x 4,6 mm x 10 µm; comprimento de onda (λ) 255 e 370 nm; vazão 0,5 mL/min; concentração das amostras 3 mg/mL; volume de injeção 50 µL; fase móvel MeOH 1% (v/v) de AcEtO e H₂O com 1% (v/v) AcEtO (A); gradiente 0-5 min (10%) B / 5-20 min (50% B) / 20-40 min (50% B) / 40-50 min (100% B) / 50/70 min (10% B).

5.2.4 Coleta dos órgãos

Após sete dias da administração dos fármacos, as fêmeas foram eutanasiadas por sobredose de anestésicos (RN 13 de 2013 – CONCEA). Os fármacos para eutanásia foram quetamina (450 mg/kg) e xilazina (45 mg/kg), aplicados por via intraperitoneal (PAIVA, 2005). Em seguida, foram coletados ovários, baço, coração, estômago, fígado, pulmões, rins e útero.

Todos os órgãos foram pesados, submetidos à análise macroscópica e, em seguida, fixados em formol tamponado 10% por 12-24 h em temperatura ambiente e destinados à análise histopatológica. O peso relativo dos órgãos foi calculado dividindo-se o peso do órgão pelo peso do animal e multiplicando-se por 100.

5.2.5 Análise da morfologia folicular e da densidade de células do estroma ovariano

As amostras ovarianas fixadas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes seriados de 8 µm foram realizados, alinhados em ordem em lâminas de vidro e

corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação do número de folículos, da morfologia folicular e da densidade das células do estroma ovariano. Após processamento histológico, os folículos foram contados e classificados, utilizando um microscópio de luz acoplado com uma câmera fotográfica Axiocam 105 color da Zeiss considerando três critérios: 1) estágio de desenvolvimento – primordial, com oócito cercado por uma camada parcial ou completa de células da granulosa escamosa; primário, com única camada de células da granulosa cuboidal; ou secundário, com mais de uma camada de células da granulosa sem antro visível (MYERS *et al.*, 2004; Figura 02). 2) aspecto morfológico – normal (oócito e células da granulosa intactas) ou atrésico (apresentando picnose nuclear, retração citoplasmática e/ou destacamento das células da granulosa da membrana basal) (MORITA e TILLY, 1999). 3) densidade das células do estroma ovariano – avaliada por meio da contagem do número de células do estroma, em uma área de 100 µm x 100 µm (CARVALHO *et al.*, 2014). Para cada grupo experimental, 10 campos por corte histológico foram avaliados, resultando um total de 60 campos por grupo, e o número médio de células de estroma por campo foi calculado.

5.2.6 Avaliação anatomopatológica dos órgãos

Após coletados, os órgãos foram avaliados macroscopicamente segundo aspectos de cor, tamanho e textura. Os órgãos fixados foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e processados para inclusão em parafina segundo as técnicas habituais. Os tecidos embebidos em parafina foram cortados em micrótomo ajustado para 5 µm e, então, submetidos à técnica de coloração por HE.

Inicialmente, os órgãos foram avaliados de forma semiquantitativa em microscópio de luz, considerando a presença de alterações como: fenômenos degenerativos, presença e tipo morfológico de inflamação, presença de congestão, morte celular (apoptose e necrose), tipos morfológicos de necrose. A partir das alterações histológicas encontradas nas análises semiquantitativas, foram realizadas avaliações morfométricas em imagens digitalizadas em formato TIFF, as quais foram analisadas com auxílio da câmera fotográfica Axiocam 105 color da Zeiss, programa Zen 2.4.4. Por estar ligado diretamente ao sistema reprodutor das fêmeas, foi

realizada análise adicional do útero a partir das medidas do miométrio, endométrio e epitélio lumial de cada animal, segundo GOMES *et al.*, 2009, com o mesmo analisador de imagens, uma vez que a diferença na espessura destas camadas pode indicar alteração morfológica.

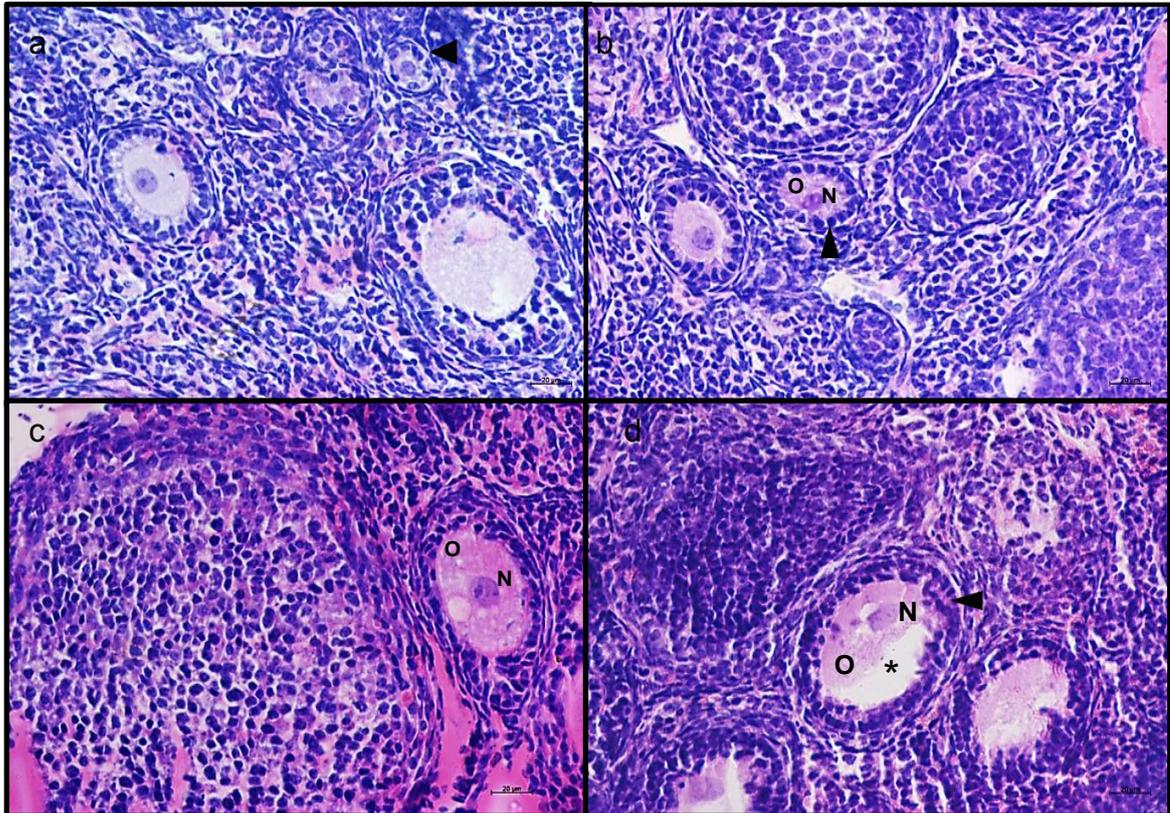


Figura 02. Fotomicrografias de secções histológicas de folículos em tecido ovariano de camundongos fêmeas. a: folículo primordial normal (seta) com células da granulosa em formato pavimentoso (ponta da seta); b: folículo primário normal (seta) com célula da granulosa em formato cuboide (ponta da seta); c: folículo secundário normal (seta); d: folículo ovariano secundário atrésico (seta), a ponta da seta indica desorganização das células da granulosa, o asterisco indica retração citoplasmática. O: oócito, N: núcleo do oócito. Coloração hematoxilina-eosina. Escala 20 µm.

5.2.7 Análise estatística

Foi realizada análise exploratória sobre o banco de dados. Os resultados foram analisados por estatística descritiva e os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene para confirmar a distribuição normal e a homogeneidade da variância, respectivamente. De acordo com a natureza dos dados foram utilizados testes de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis e

pós-testes. As análises foram realizadas com auxílio dos softwares SPSS 20.0 ou R 3.3.2. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Rendimento e caracterização do extrato

O rendimento do extrato etanólico de *A. muricata* foi 22053 mg ou 13,83% em relação ao peso das folhas secas e os testes fitoquímicos qualitativos deste extrato demonstraram presença de ácidos orgânicos, flavonoides (flavonas, flavonóis e xantonas), alcaloides e esteroides como metabólitos secundários (Tabela 1).

O seguimento da análise deste extrato permitiu a observação de bandas correspondentes à absorção de flavonas (269 nm e 320 nm), flavonóis (370 nm e 412 nm) e clorofila (660 nm) por espectrofotometria UV-vis (Figura 3)

O cromatograma do extrato etanólico de *A. muricata*, no qual os parâmetros utilizados têm sensibilidade para detecção de flavonoides, revelou 10 picos bem definidos em detector de 350 nm, indicando presença de subclasses de flavonoides.

Quadro 1: Resultado da avaliação fitoquímica qualitativa demonstrando presença de metabólitos secundários

Classes metabólicas	Resultados
Saponina espumídica	Negativo
Ácidos orgânicos	Positivo
Açúcares redutores	Negativo
Polissacarídeos	Negativo
Fenóis e taninos	Negativo
Flavonoides	Positivo
Alcaloides	Positivo
Purinas	Negativo
Esteroides	Positivo
Triterpenoides	Negativo

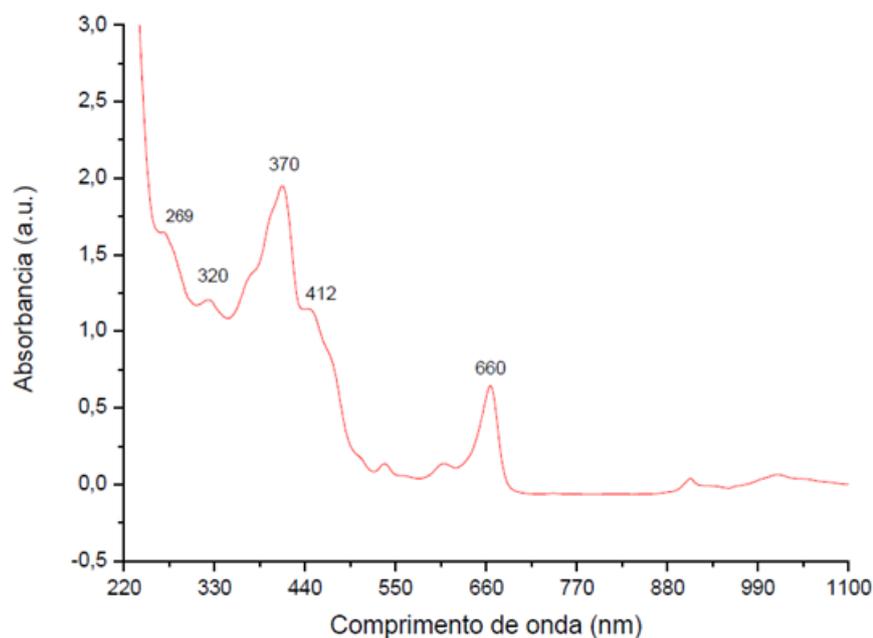


Figura 3: Espectros de absorção UV-vis do extrato etanólico de *A. muricata* na concentração 0,187 mg extrato / 1 mL etanol 95%. Em evidência as bandas 269 nm, 320 nm, 370 nm, 412 nm e 660 nm.

5.3.2 Análise folicular e densidade de células do estroma

Foram avaliados 7.122 folículos ovarianos neste estudo. Utilizando um fator de correção (total contados multiplicado por 5), pôde-se chegar a um total de 35.610 folículos. A figura 4A mostra o número total de folículos contabilizados em cada grupo experimental. Pode-se observar que a quantidade de folículos ovarianos após administração do extrato de graviola, independente da dose utilizada, foi significativamente superior ao controle negativo (grupo S) e ao grupo no qual a ciclofosfamida foi administrada (grupo C). Em adição, não ocorreu diferença significativa na quantidade total de folículos entre o grupo S e o grupo C ($p > 0,05$).

A quantidade total de folículos por animal foi, em seguida, classificada de acordo com sua morfologia folicular em folículos normais ou atrésicos (Figura 4B). Em média, 6.720 folículos apresentaram-se morfologicamente normais no controle (grupo S) e 700 atrésicos. Em contrapartida, 3.335 folículos apresentaram-se morfologicamente normais no grupo C e 3.235 atrésicos. Os grupos tratados com extrato apresentaram 10.315 normais e 725 atrésicos (grupos G50) e 9.535 normais e 1.010 atrésicos (grupo G100). Portanto, a média de folículos atrésicos foi

significativamente superior no grupo C em relação aos demais grupos e o grupo G50 apresentou maior número de folículos totais e normais.

A análise da morfologia folicular permitiu a diferenciação do estágio de desenvolvimento folicular em primordiais, primários e secundários. A quantificação dessas categorias foi realizada nos quatro grupos e os resultados estão na Figura 4C.

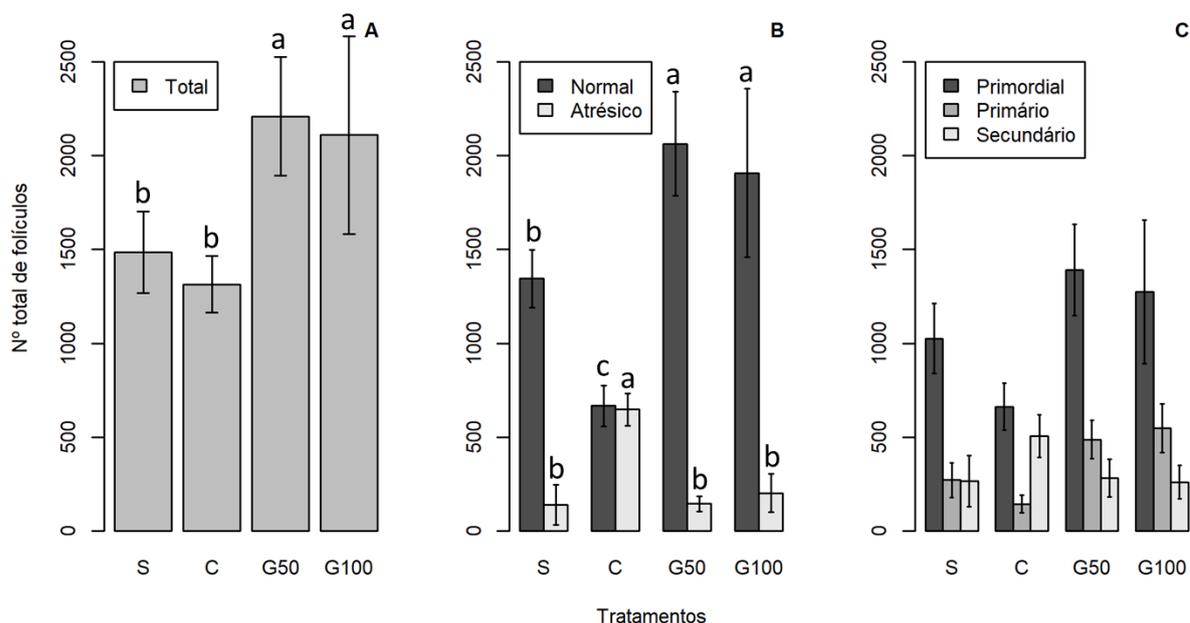


Figura 4: Análise da morfologia folicular ovariana. A) Média de folículos totais por grupo. B) Média da quantidade de folículos normais e atrésicos por grupo. C) Quantificação dos folículos de acordo com as principais classificações do estágio do desenvolvimento folicular: primordiais, primários e secundários. S: grupo salina; C: grupo ciclofosfamida 75 mg/kg; G50: grupo extrato de graviola 50 mg/kg; G100: grupo extrato de graviola 100 mg/kg. Valores expressos como média \pm DP (n = 5). Letras diferentes (a, b, c) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

A contagem das células do estroma ovariano não inferiu diferenças significativas entre os grupos estudados (P > 0,05; Figura 5). A Figura 6 ilustra as células do estroma ovariano para os quatro grupos.

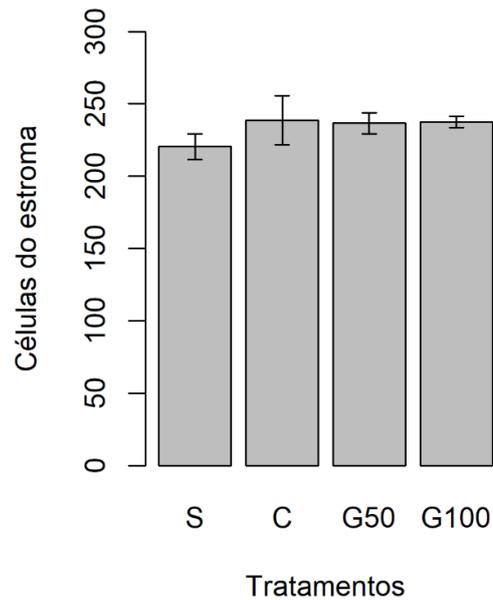


Figura 5: Densidade das células do estroma ovariano nos diferentes grupos analisados (S: grupo salina; C: grupo ciclofosfamida 75 mg/kg; G50: grupo extrato de graviola 50 mg/kg; G100: grupo extrato de graviola 100 mg/kg). Valores expressos como média \pm DP (n = 5/grupo).

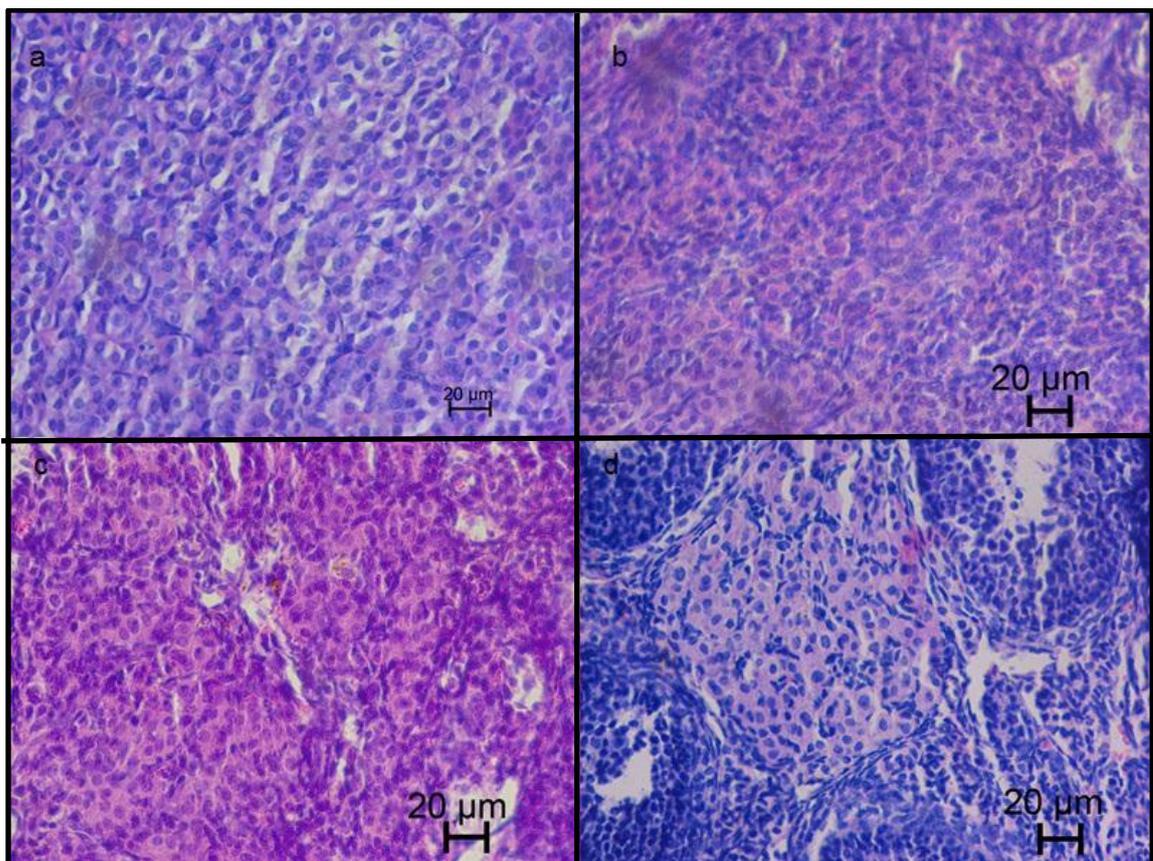


Figura 6: Fotomicrografias de corte histológico do ovário mostrando células do estroma. a) Grupo S; b) Grupo C; c) Grupo G50; d) Grupo G100. Coloração hematoxilina-eosina. Escala 20 μ m.

5.3.3 Análise anatomopatológica dos órgãos

A média de perda de peso dos animais e a distribuição do peso relativo de todos os órgãos não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). Em adição, a análise macroscópica dos órgãos mostrou-se normal quanto à cor/pigmentação e textura de todos os órgãos avaliados entre os grupos S, G50 e G100. Todos os animais do grupo C, no entanto, apresentaram órgãos com muco esbranquiçado, sendo essa característica mais evidente nos órgãos da cavidade abdominal (Figura 7).

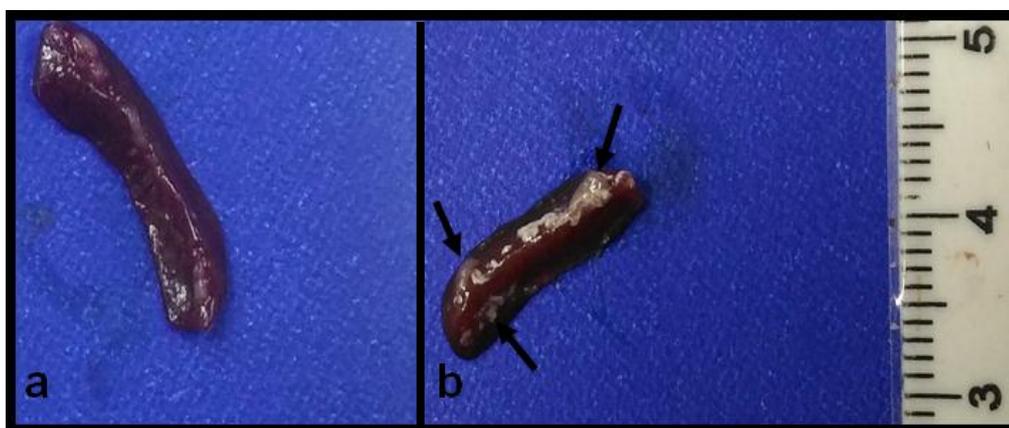


Figura 7: Imagens comparativas entre baços, evidenciando a diferença de textura da membrana externa do órgão. a) grupo S e b) grupo C. As setas indicam depósito de muco esbranquiçado.

A avaliação microscópica do baço, coração, estômago, pulmões e rins dos grupos C, G50 e G100 não mostrou alterações distinguíveis em relação ao veículo (grupo S).

A avaliação do fígado permitiu a observação do espaço porta e da conformação dos vasos, estando os mesmos normais em todos os tratamentos. Porém, em relação aos hepatócitos, no Grupo C pôde-se observar tumefação e consequente vacuolização citoplasmática na maior parte dos mesmos. O grupo do extrato G50 não apresentou qualquer alteração quando comparado ao controle (grupo S). No grupo G100, no entanto, algumas células tumefeitas puderam ser observadas, mas sem vacuolização citoplasmática avançada quando comparadas ao grupo C (figura 8).

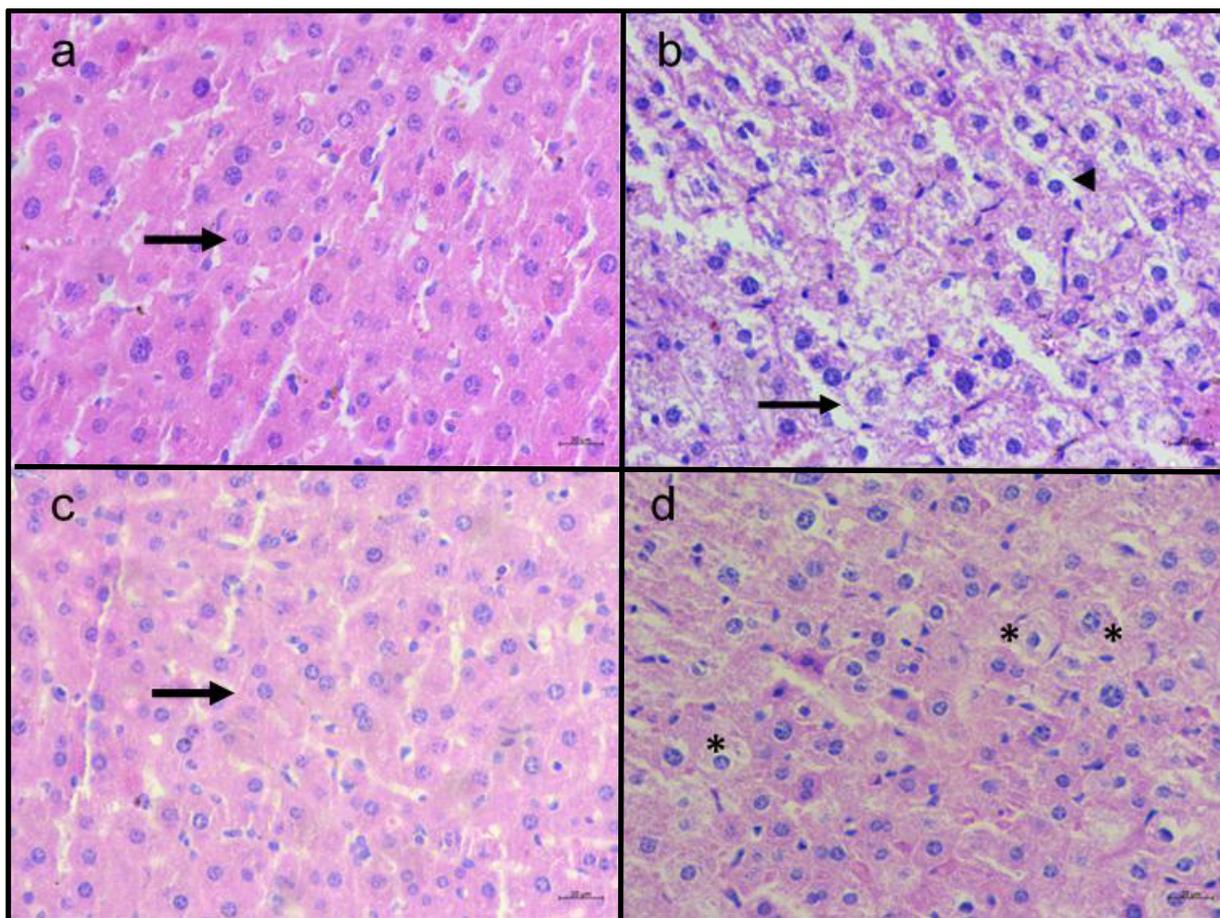


Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado. a) Grupo S, hepatócito normal (seta); b) Grupo C, hepatócito tumescente (seta), vacuolização citoplasmática (ponta da seta); c) Grupo G50, hepatócito normal (seta); d) grupo G100, células tumescentes (asteriscos). Coloração hematoxilina-eosina. Escala 20 μ m.

Após a avaliação da espessura uterina foi observada uma espessura significativamente maior do epitélio luminal no grupo C quando comparado ao grupo G50. No entanto, de acordo com comparações múltiplas não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos. Da mesma forma, não houve diferenças entre as espessuras do endométrio e miométrio entre os grupos (Figura 9).

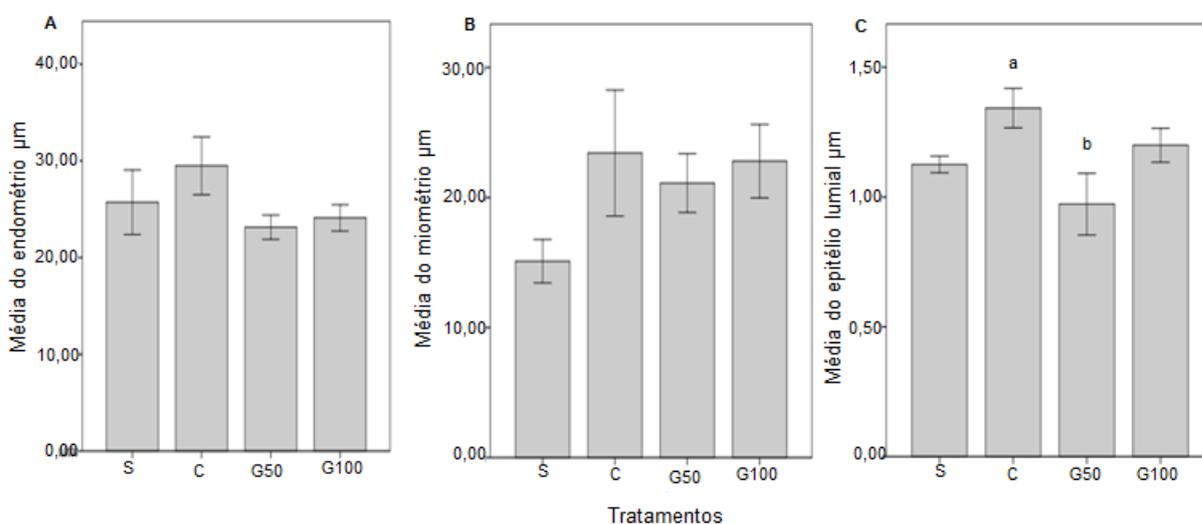


Figura 9: Análise morfométrica do útero. A) Média da espessura do endométrio. B) Média da espessura do miométrio. C) Média da espessura do epitélio luminal. S: grupo salina; C: grupo ciclofosfamida 75 mg/kg; G50: grupo extrato de graviola 50 mg/kg; G100: grupo extrato de graviola 100 mg/kg. Valores expressos como média \pm DP (n = 5). Letras diferentes (a, b) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p <0,05).

5.4. DISCUSSÃO

A utilização das terapias anticâncer convencionais causam danos severos à fertilidade feminina. Grande parte dos agentes quimioterápicos podem causar alterações nos oócitos e células da granulosa e da teca (OKTAY e ROSENWAKS, 2001). Tratamentos alternativos à base de produtos naturais tornam-se uma saída. Porém, a importância de um fármaco não se resume às suas atividades biológicas sendo necessários estudos extensivos sobre seus os efeitos colaterais. Nesse sentido, o presente estudo avalia pela primeira vez o efeito do extrato etanólico da graviola sobre a reserva ovariana em camundongos fêmeas *in vivo*.

O tipo de solvente utilizado para a extração influencia tanto no rendimento quanto no percentual dos metabólitos secundários dos diferentes extratos de plantas (MACIEL, PINTO e VIEGA JR, 2002). O rendimento do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* obtido neste estudo foi de 13,83%, diferente do rendimento observado com solvente metanólico (7,12%) e extratos aquosos (3,62%) (BASKAR e KUMAR,

2007; ADEWOLE e OJEWOLE, 2009), 2,62% (ASARE et al., 2014) e 15% (GEORGE, et al., 2015), demonstrando maior rendimento médio.

A avaliação do extrato utilizado neste estudo corrobora com estudos anteriores, nos quais há confirmação da presença de metabólitos secundários em *A. muricata* como ácidos orgânicos, flavonoides (flavonas, flavonóis e xantonas), alcaloides e esteroides (PIEME, et al., 2014; SOLOMON-WISDOM e MOHAMMED, 2014; GEORGE, et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Outros estudos, ainda, descreveram presença de outras classes de metabólitos secundários como acetogeninas, a partir de técnicas adicionais e diferentes partes da planta (WELÉ et al., 2003; WU et al., 2006).

Essa caracterização do extrato foi útil para confirmar a presença de ativos para administração nos animais, visto que os flavonoides e alcaloides possuem efeitos terapêuticos. Os flavonoides, detectados pela CLAE, possuem, principalmente, atividades anti-inflamatória, antioxidantes e antineoplásica (MACHADO et al., 2008). Como consequência, essas propriedades terapêuticas levam muitas mulheres a fazerem uso de extratos com estes metabólitos no intuito de reduzir os sintomas da menopausa (MACHADO et al., 2008). Da mesma forma, os alcaloides também possuem atividades anti-inflamatória, antioxidante e citotóxica (CASTILHOS, et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Por outro lado, fármacos utilizados comumente no tratamento de neoplasias, principalmente os agentes alquilantes (ciclofosfamida) podem provocar, dentre outros efeitos, diminuição ou perda da fertilidade devido à perda da função ovariana (GUERREIRO et al., 2015; BRITO, GUIMARÃES e LANNA, 2001). Segundo Silva (2014), estes fármacos também podem agir de maneira indireta, alterando o desenvolvimento e a histofisiologia do sistema genital da prole feminina de ratas Wistar ao cruzar com machos sob tratamento com agente quimioterápico (SILVA, 2014).

Em relação aos efeitos colaterais de *A. muricata* foram relatados apenas neurotoxicidade quando utilizada fração purificada de alcaloides (ROTTSCHOLL et al., 2016) e toxicidade em estudo contra o câncer de próstata em camundongos quando utilizada a fração enriquecida com acetogenina (YANG et al., 2015). Em estudos *in vivo*, a utilização do extrato bruto não revelou prejuízos significativos (HANSRA, SILVA e MEHTA, 2014; FLORENSE et al., 2014).

Em nosso estudo, a avaliação histológica do ovário revelou que o extrato etanólico obtido das folhas de graviola não afetou o número total de folículos, mantendo intacta sua morfologia. Adicionalmente, o mesmo não causou danos às células do estroma ovariano, mantendo sua densidade normal. Essa resposta possivelmente ocorreu devido às propriedades fitoquímicas e atividades biológicas já descritas desta planta como atividade anti-inflamatória, antioxidante e antineoplásica e, ao mesmo tempo, especificidade em relação às células tumorais (LORENZI e MATOS, 2008; BARATA *et al.*, 2009; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015).

A avaliação macroscópica e microscópica de outros órgãos, adicionalmente aos ovários, foi realizada pela importância da avaliação dos efeitos sistêmicos do extrato de graviola, uma vez que a corrida científica busca terapias anticânceres alternativas que findem ou pelo menos reduzam os efeitos colaterais severos dos fármacos convencionais sejam na função reprodutiva ou em outras funções vitais. Dessa forma, a preservação da estrutura uterina após tratamento com o extrato de graviola, particularmente, confirma a não agressão deste extrato sobre outro órgão reprodutivo. Em contraposição, o grupo tratado com a ciclofosfamida 75 mg/kg apresentou maior espessura média do epitélio lumial em relação ao grupo G50 e, embora de acordo com as inferências estatísticas, essas diferenças não tenham sido significativas em relação às medidas do endométrio e miométrio, nota-se que no grupo C essas medidas foram maiores em relação aos demais grupos. Sabe-se que as diferentes espessuras das camadas uterinas podem ser um dos fatores que interferem no desenvolvimento diferenciado dos fetos em fêmeas. A aumento na espessura ou medida das camadas uterinas podem ser resultados do aumento do número de mitoses e, conseqüentemente, da proliferação celular (GOMES *et al.*, 2009).

A preservação dos demais órgãos também foi evidenciada, sendo mostrado hepatócitos tumescentes somente após a administração da dose maior do extrato, i.e 100 mg/kg. Por se tratar de um órgão-chave para o metabolismo, a dose de 50 mg/kg parece ser a mais adequada para a manutenção da fertilidade dessas fêmeas, bem como para a manutenção da homeostase do organismo como um todo.

5.5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que administração do extrato de folhas de graviola em ambas as doses utilizadas não foi tóxica para folículos ovarianos, não prejudicando, dessa forma, a reserva ovariana. Adicionalmente, o extrato na concentração 50 mg/kg também não causou efeitos colaterais detectáveis nos demais órgãos analisados. Assim, pode haver viabilidade na utilização desse extrato em terapia anticâncer se somados a estudos posteriores que corroborem o mesmo, como a investigação de danos ao DNA das células ovarianas a partir de testes de imuno-histoquímica e análises moleculares.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, R. A.; THEMME, A. P. N.; AL-QAHTANI, A.; GROOME, N. P.; CAMERON, D. A. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. **Human Reproduction**. v. 21, n. 10, 2583-2592, July 2006.

ASARE, G.A.; AFRIYIE, D.; NGALA, R.A.; ABUTIATE, H.; DOKU, D.; MAHMOOD, S.A.; RAHMAN, H. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. On the prostate, BPH-1 cells, and some target genes. **Integrative Cancer Therapy**. v. 14, n. 1, 65-74, Jan 2015.

BARATA, L. E. S.; ALENCAR, A. A. J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. Plantas Mediciniais Brasileiras IV. *Annona muricata* L. (graviola). **Revista Fitos**. v. 4, n.1, p. 132-138, março 2009.

BARBOSA, W. L. R.; QUINARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Revista Científica da Universidade Federal do Pará. Disponível em http://www.ufpa.br/rcientifica/didaticos_cientificos/pdf_textos/abord_fitoquimica.pdf , acessado em janeiro de 2018.

CHANG, F.R.; LIAW, C.C.; LIN, C.Y.; CHOU, C.J.; CHIU, H.F.; WU, Y.C. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**, v. 69, n. 3, p. 241-246, 2003.

DE CARVALHO, J.M.; DOS SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E.G. Estudo da atividade moluscicida da *Annona muricata*. XXIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas, **Anais do Congresso, QB-028**, 2000.

GOMES, R. C. T.; OLIVEIRA, P. B.; ROSSI, A. G. Z.; BARACAT, M. C. P.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES JUNIOR, J. M. Efeitos da hiperprolactinemia sobre

o útero de camundongos no proestro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 31, n. 8, p. 385-390, aug, 2009.

HANSRA, D.M.; SILVA, O.; MEHTA, A.; AHN, E. Patient with metastatic breast cancer achieves stable disease for 5 years on graviola and xeloda after progressing on multiple lines of therapy. **Advances in Breast Cancer Research**. v. 3, n. 3, p. 84-87, july 2014.

KIM, G.S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L.L.; WU, F.E.; SASTRODIHARDJO, S.; MCLAUGHLIN J.L. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata* in honour of professor G.H. Neil Towers 75th birthday. **Phytochemistry**, v.49, n. 2, p.565-571, sept 1998.

LIAW, C.C.; CHANG, F.-R.; LIN, C.-Y.; CHOU, C.-J.; CHIU, H.-F.; WU, M.-J.; WU, Y.-C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 65, n. 4, p. 470-475, march 2002.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas - 2a. Ed.** - Ed. Plantarum - Nova Odessa - pp. 67. 2008.

LONGO, D. L. **Hematologia e Oncologia de Harrison**. 2° ed. Ed. Artmed. p. 538. 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil Nativas e Exóticas**. Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Nova Odessa, p.60-61, 2002.

MALTARIS, T.; SEUFERT, R.; FISCHL, F.; SCHAFFRATH, M.; POLLOW, K.; KOELBL, H.; DITTRICH, R. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preservinv fertility. **Endocrinology and reproductive biology**. 130, n. 2, 148-155, feb 2007.

MEIROW, D.; BIEDERMAN, H.; ANDERSON, R. A.; WALLACE, W.H. B. Toxicity of chemotherapy and Radiation on Female Reproduction. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. v. 53, n. 4, p. 727-739, 2010.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Human Reproduction**. v. 7, n. 6, p. 535-543, 2001.

MINARI, J.; 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. 327-334, oct. 2014.

MYERS, M.; BRITT, K. L.; WREFORD, N. G. M.; EBLING, F. J. P.; KERR, J. B. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Society for Reproduction and Fertility**. v. 127, p. 569-580. 2004.

NAJMUDDIN, S. U. F. S.; ROMLI, M. F.; HAMID, M.; ALITHEEN, N. B.; RAHMAN, N. M. A. N. A. Anti-cancer effect of *Annona muricata* linn leaves crude extract (AMCE)

on breast cancer cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 16, n. 311, p. 1-20, 2016.

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, dec. 2014.

QUEIROZ, N.A.; ALESSI, A.C.; SANT'ANA, A.E.; ZAMBIANCHI, A.R. Avaliação toxicológica do chá de graviola. 1988. X SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, São Paulo, **Anais do Congresso, 5/P52**, 1988.

ROTTSCHOLL, R.; HAEGELE, M.; JAINSCH, B. *et. al.* Chronic consumption of *Annona muricata* juice triggers and aggravates cerebral tau phosphorylation in wild-type and MAPT transgenic mice. **Journal of Neurochemistry**. v. 139, p. 624-639, sept. 2016.

SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H.; SUN, X.; ZHOU, K. Three new anti-proliferative annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v.24, n. 12, p. 2773-2776, june 2014.

5 CONCLUSÃO

Em contraposição a outras patologias, a heterogeneidade do câncer ainda não possibilitou terapias que permitam a qualidade de vida das pacientes e não causem falências de outros órgãos que não seja aquele objeto direto do tratamento. A comprovação dos danos causados pelas terapias anti-câncer à função reprodutiva em mulheres abre espaço para novas pesquisas com o intuito de conseguir contorná-los de modo a permitir melhor qualidade de vida e/ou cura.

Os produtos naturais com atividade antineoplásica comprovada, necessitam de maior atenção no que tange aos seus efeitos colaterais e interações medicamentosas para serem utilizados, afim de não haver respostas gonadotóxicas semelhantes aos fármacos antineoplásicos convencionais.

Dessa forma, a não toxicidade do extrato de *Annona muricata* sobre a reserva ovariana de camundongos fêmeas possibilita novos estudos que confirmem seus benefícios.

REFERÊNCIAS

ADEWOLE, S.; OJEWOLE, J. Protective effects of *Annona muricata* linn.(annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal Traditional Complementary and Alternative Medicines**. v. 6, n. 3, p. 30-41, oct. 2008.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem cm o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 188-129, feb. 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/staging.html>, acessado em 18/04/2018.

ANDERSON, R. A.; THEMEN, A. P. N.; AL-QAHTANI, A; GROOME, N. P.; CAMERON, D. A. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. **Human Reproduction**. v. 21, n. 10, 2583-2592, july 2006.

ARISAWA, E. A. L.; SILVA, C. M. O. M.; CARDOSO, C. A. C.; LEMOS, N. R. P.; PINTO, M. C. Efeitos colaterais da terapia antitumoral em pacientes submetidos à químio e à radioterapia. **Revista de Biociências**. v. 11, n. 1-2, p. 55-61, jan-jun, 2005.

ASARE, G.A.; AFRIYIE, D.; NGALA, R.A.; ABUTIATE, H.; DOKU, D.; MAHMOOD, S.A.; RAHMAN, H. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. On the prostate, BPH-1 cells, and some target genes. *Integrative Cancer Therapy*. v. 14, n. 1, 65-74, jan 2015.

AVRIL, C. L'ovocyte: avancées fondamentales et thérapeutiques. Peut-on prédire la qualité ovocytaire par l'échographie? *Journal Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reprod*. v. 35, n. 2, p. 42-43, sept 2006.

AZAM, F.; MEHTA, S.; HARRIS, A. L. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. **The European Journal of Cancerology**. v. 46, n. 8, p. 1323-1323, may 2010.

BARATA, L. E. S.; ALENCAR, A. A. J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. Plantas Mediciniais Brasileiras IV. *Annona muricata* L. (graviola). **Revista Fitos**. v. 4, n.1, p. 132-138, março 2009.

BARBOSA, W. L. R.; QUINARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Revista Científica da Universidade Federal do Pará*. Disponível em http://www.ufpa.br/rcientifica/didaticos_cientificos/pdf_textos/abord_fitoquimica.pdf , acessado em janeiro de 2018.

BLUMENFELD, Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. **Oncologist**, v.12, n. 9, p.1044-1054, sep 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2018. 128 p.

BRASIL 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 90 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o Guia para os estudo de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer. **Ações de enfermagem para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Pro-Onco, 240p, 1995.

BONASSA, E. M. A; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3ª ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 2005. 540p.

BRITO, C.; PORTELA, M. C.; VASCONCELLOS, M. T. L. Fatores associados à persistência à terapia hormonal em mulheres com câncer de mama. **Revista de Saúde Pública**. v. 48, n. 2, p. 284-295, 2014.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. **Quimioterapia das doenças neoplásicas**. Em: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G., editors. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutic. 10ª ed. New York: McGraw-Hill. p. 1381-1459, 2001.

CASTRO, E. C.; FLORÊNCIO, R. S.; FILHO, G. M.; AMARAL, W. N. Folículos antrais como marcadores da reserva ovariana. *Reprodução e Climatério*. v.26, n. 1, p. 7-11. 2010.

CHANG, F.R.; LIAW, C.C.; LIN, C.Y.; CHOU, C.J.; CHIU, H.F.; WU, Y.C. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**, v. 69, n. 3, p. 241-246, 2003.

CHUANG, C.C.; CHEN, C.D.; CHAO, K.H.; CHEN, S.U.; HO, H.N.; YANG, Y.S. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. v.1, n. 79, p. 63-68, 2003.

CRIADO, P. R.; BRANDT, H. R. C.; MOURE, E. R. D.; PEREIRA, G.L.S.; SANCHES JUNIOR, J.A. Reações tegumentares adversas relacionadas aos agentes antineoplásicos – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 599, 2010.

DE ANDREA, C. E.; SOBRAL, A. C. L.; DA COSTA, E. S. M.; TOTSUGUI, J. T.; DE ARAÚJO, S. R.; COLLAÇO, L. M. Citologia do derrame papilar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**. v. 42, n. 5, p. 333-337, out. 2006.

DE CARVALHO, J.M.; DOS SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E.G. Estudo da atividade moluscicida da *Annona muricata*. XXIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas, **Anais do Congresso, QB-028**, 2000.

DE VET, A.; LAVEN, J. S. E.; DE JONG, F.H.; THEMME, A. P. N.; FAUSER, B. C. J.M. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. **Fertility and Sterility**. v. 77, n. 2, p. 357-362, feb. 2002.

De VITA, V. T.; CHU E. A history of câncer chemotherapy. **Cancer Reserch**. v. 68, n. 21, p.8643-8653, nov 2008.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Cancer treatment**. v. 36, n. 3, p. 34-38, 2017.

DIMOPOULOS, M. A.; PAPADIMITRIOU, C.; HAMILOS, G.; EFSTATHIOU, E.; VLAHOS, G.; RODOLAKIS, A.; ARAVANTINOS, G.; KALOFONOS, H.; KOUROUSSIS, C.; GIKA, D.; SKARLOS, D.; BAMIAS, A. Treatment of ovarian germ cell tumors with a 3-day bleomycin, etoposide, and cisplatin regimen: a prospective multicenter study. **Gynecologic Oncologic**. v. 95, n. 3, p. 695-700, dec 2004.

DUN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: currente analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in analytical chemistry**. v. 24, n. 4, p. 285-294, april 2005.

EVERS, J. L.; SLAATS, P.; LAND, J.A.; DUMOULIN, J. C.; DUNSELMAN, G. A. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**. v. 69, n. 6, p. 1010-1014, june 1998.

EZIRIM, A.; OKACHI, V.; JAMES, A.; ADEBESHI, O.; OGUNNOWO, S.; ODEGHE, O. Induction of apoptosis in myelogenous leukemic k562 cells by ethanolic leaf extract of *Annona muricata*. **Indian Journal Drug Discovery**. v. 2, n. 3, p. 142-151, march 2013.

FONSECA, S. M.; ALMEIDA, E. P. M; MASSUNAGA, V.M. **Administração dos quimioterápicos**. In: Fonseca SM, Machado RCL, Paiva DRS, Almeida EPM, Massunaga VM, Junior WR, et al. Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro (RJ). Reichmann e Affonso. 2000. p. 16-9.

FIÇICIOGLU, C.; KUTLU, T.; BAGLAM, E.; BAKACAK, Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**. v. 85, n. 3, p. 592-596, march 2006.

GIACOMINI, G; MENEZES, H. Técnicas e perspectivas em imunoterapia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 5, n. 3, p. 567-578, dez 2012.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 48, n. 6, p. 463-474, dez 2012.

GOLÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Roca, 2ªed, 2008. 395p.

GOMES, R. C. T.; OLIVEIRA, P. B.; ROSSI, A. G. Z.; BARACAT, M. C. P.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES JUNIOR, J. M. Efeitos da hiperprolactinemia sobre o útero de camundongos no proestro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 31, n. 8, p. 385-390, aug, 2009.

GOSDEN, R.G.; BOLAND, N.I.; SPEARS, N.; MURRAY, A.A.; CHAPAMN, M.; WADE, J.C.; ZOHDY, N.I. The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. *Reproductive Medicine Review*. v.2, n. 3, p.129-152, oct. 1993.

HALL, J. M.; LEE, M. K.; NEWMAN, B.; MORROW, J. E.; ANDERSON, L. A.; HUEY, B. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**. v. 250, n. 4988, p.1684-689, dec. 1990.

HANSRA, D.M.; SILVA, O.; MEHTA, A.; AHN, E. Patient with metastatic breast cancer achieves stable disease for 5 years on graviola and xeloda after progressing on multiple lines of therapy. **Advances in Breast Cancer Research**. v. 3, n. 3, p. 84-87, july 2014.

HCB. **Hospital do Câncer de Barretos**. Disponível em <https://www.hcancerbarretos.com.br/quimioterapia-2/76-paciente/opcoes-de-tratamento/quimioterapia/quimioterapia-e-os-efeitos-colaterais/117-efeitos-colaterais-infertilidade>. Acessado em 15 de abril de 2018.

HENDRIKS, D. J.; KWEE, J.; MOL, B. W. J.; TE VELDE, E.R.; BROEKMANS, J.M. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. **Fertility and Sterility**. v. 87, n. 4, p. 764-775, april 2007.

HOLETZ, P. B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 7, p. 1027-1031, oct. 2002.

HOSKINS, P.J.; SWENNERTON, K. D.; PIKE, J. A.; WONG, F.; LIM, P.; ACQUINO-PARSONS, C.; LEE, N. Paclitaxel and carboplatin, alone or with irradiation, in

advanced or recurrent endometrial cancer: a phase II study. **Journal of Clinical Oncology**. v. 19, n. 20, p. 4048-53, oct 2000.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Agentes Quimioterápicos. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101, acessado em 20/04/2018.

JAIN, T.; SOULES, M.R.; COLLINS, J.A. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test of ovarian reserve screening. **Fertility and Sterility**. v. 82, n. 1, p. 180-185, july 2004.

KIM, G.S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L.L.; WU, F.E.; SASTRODIHARDJO, S.; MCLAUGHLIN J.L. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata* in honour of professor G.H. Neil Towers 75th birthday. **Phytochemistry**, v.49, n. 2, p.565-571, sept 1998.

LIAW, C.C.; CHANG, F.-R.; LIN, C.-Y.; CHOU, C.-J.; CHIU, H.-F.; WU, M.-J.; WU, Y.-C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 65, n. 4, p. 470475, march 2002.

LONG, H. J.; BUNDY, B. N.; GRENDYS JR, E. C.; BENDA, J. A.; McMEEKIN, D. S.; SOROSKY, J.; MILLER, D. S.; EATON, L. A.; FIORICA, J. V. Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**. v. 23, n. 21, p. 4626-33, jul 2005.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas - 2a. Ed.** - Ed. Plantarum - Nova Odessa - pp. 67. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil Nativas e Exóticas.** Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Nova Odessa, p.60-61, 2002

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MACMAHON, B. Risk factors for endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**. v. 2, n. 2, p. 122-129, aug.1974.

MAHESHWARI, A.; FOWLER, P.; BHATTACHARYA, S. Assessment of ovarian reserve-should we perform tests of ovarian reserve routinely? **Human Reproduction**. v.21, n. 11, p. 2729-2735, aug. 2006.

MALTARIS, T.; SEUFERT, R.; FISCHL, F.; SCHAFFRATH, M.; POLLOW, K.; KOELBL, H.; DITTRICH, R. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preservinv fertility. **Endocrinology and reproductive biology**. 130, n. 2, 148-155, feb 2007.

MANICA, I. **Taxonomia, morfologia e anatomia.** In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. Anonáceas: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. p. 20-35. 1997.

MARKMAN, M.; KENNEDY, A.; WEBSTER, K.; PETERSON, G.; KULP, B.; BELINSON, J. Combination chemotherapy with carboplatin and docetaxel in the treatment of cancers of the ovary and fallopian tube and primary carcinoma of the peritoneum. **Journal of Clinical Oncology**. v. 19, n. 7, p. 1901-1905, apr 2001.

MAO, J. J. XIE, S. X.; FARRAR, J. T.; STRICKER, C. T.; BOWMAN, M. A.; BRUNER, D.; DeMICHELE, A. A randomized trial of electro-acupuncture for arthralgia related to aromatase inhibitor use. **European Journal of Cancer**. v. 50, n. 1, p. 267-276. 2014

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, n.4, p.433-442, dez. 2007

MILLER, A. B.; HOOGSTRENTEN, B.; STAQUET, M.; WINKLER, A. Reporting results of cancer treatment. **Cancer**. v. 47, n. 1, p. 207-214, jan 1981.

MATTAR, A.; ELLIS, M.; HEGG, R. Hormonioterapia neoadjuvante no câncer de mama. **Revista Brasileira de Medicina** v.1, n. 1, p. 201-207, nov 2011.

MEIROW, D.; BIEDERMAN, H.; ANDERSON, R. A.; WALLACE, W.H. B. Toxicity of chemotherapy and Radiation on Female Reproduction. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. v. 53, n. 4, p. 727-739, 2010.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Human Reproduction**. v. 7, n. 6, p. 535-543, 2001.

MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P. A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S. A strong candidate for the BRCA and breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**. v. 266, n. 5182, p. 66-71, oct. 1994.

MINARI, J.; 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. 327-334, oct. 2014.

MYERS, M.; BRITT, K. L.; WREFORD, N. G. M.; EBLING, F. J. P.; KERR, J. B. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Society for Reproduction and Fertility**. v. 127, p. 569-580. 2004.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; ROUHOLLHI, E.; ARIMIAN, H.; FADAEINASAB, M.; FIROOZINIA, M.; ABDULLA, M.A.; KADIR, H.A. The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of acetogenin annomuricin E in HT-29 cells: A bioassay-guided approach. **Plos one**. v. 10. n. 4, p. 1-28, april 2015a.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 7, p. 15625-15658, july 2015b

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; KADIR, H.A.; PAYDAR, M.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-

mediated pathway and involvement of NF- κ B. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 14, n. 299, aug. 2014a.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H.; FADAEINASAB, M.; ABDULLA, M.A.; KADIR, H.A. Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. **Drug Design Development and Therapy**. v. 8, p. 2099-2111, oct. 2014b.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**. v. 213, n. 1, p.1-17, sept. 1999.

MORS, B.W.; RIZZINI, T.C.; PEREIRA, A.N. **Medicinal plants of Brazil**. Defilipps, R. A. Ed. References Publications, Inc., p.13, 2000.

MORTON, J.S. In: **Fruits of warm climates**. Ed. Julia F. Morton, Miami, FL, p.75-80, 1987.

MURAD, A.M.; KATZ, A. **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**. Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41. 1996.

MUKHERJEE, S. O imperador de todos os males: uma biografia do câncer. Companhia das Letras. 2012. 640 p.

OKTAY, K.; SONMEZER, M.; OKTEM, O.; FOX, K.; EMONS, G.; BANG, H. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. **The Oncologist**, v.12, p.1055-1066, july 2007.

NAJMUDDIN, S. U. F. S.; ROMLI, M. F.; HAMID, M.; ALITHEEN, N. B.; RAHMAN, N. M. A. N. A. Anti-cancer effect of *Annona muricata* linn leaves crude extract (AMCE) on breast cancer cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 16, n. 311, p. 1-20, 2016.

PIAZZA, M. J.; URBANETZ, A. A.; CARVALHO, N. S. O impacto da radioterapia e da quimioterapia no aparelho genital feminino. **Femina**. v. 39, n. 3, mar 2011.

PICCART, M. J.; BERTELSEN, K.; JAMES, K.; CASSIDY, C. M.; SIMONSEN, G. S.; KAYE, STAN.; VERGOTE, I.; GRIMSHAW, R. B. R.; ATKINSON, R. J.; SWENERTON, K. D.; TROPE, C.; NARDI, M.; KAERN, J.; TUMOLO, S.; TIMMERS, P.; ROY, J. A.; LHOAS, F.; LINDVALL, B.; BACON, M.; BIRT, A.; ANDERSEN, J. E.; ZEE, B.; PAUL, J.; BARON, B.; PECORELLI, S. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 92, n. 9, p. 699-708, may 2000.

PIEME, C. A.; KUMAR, S. G.; DONGMO, M. S.; MOUKETTE, B. M.; BOYOUM, 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, dec. 2014.

PINHO, A. A.; MATTOS, M. C. F. I. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas de colo de útero. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 38, n. 3, p. 225-231, abr 2002.

PINTO, A. P.; TULLIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 48, n. 1, p. 73-78, 2002.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, PAUL, J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**. v. 18, n. 2, p. 281-293, june 2004.

QUEIROZ, N.A.; ALESSI, A.C.; SANT'ANA, A.E.; ZAMBIANCHI, A.R. Avaliação toxicológica do chá de graviola. 1988. X SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, São Paulo, **Anais do Congresso, 5/P52**, 1988.

RAMA, C.; MARTINS, C. R.; DERCHAIN, S.; LONGATTO FILHO, A.; GONTIJO, R.; SARIAN, L.; SYRJANEN, K.; CHING, T.; ALDRIGHI, J. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Revista de Saúde Pública**. v. 42, n. 3, p. 411-419, Jun. 2008.

RAMASWAMY e SHAPIRO, C. L. Osteopenia and Osteoporosis in Women with Breast Cancer. **Sminaris in Oncology**. v. 30, n. 6, p. 763-775. 2003.

REBAR, R.W. Premature ovarian failure. **Obstetric and Gynecology**. v.113, n. 6, p. 1355-1363, june 2009.

REMERS, W. A. **Antineoplastic agents**. In: DELGADO, J. N.; REMERS, W. A (ed.) Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins. Cap. 12, p. 343, 1998.

SBC. **Sociedade Brasileira do Câncer**. Disponível em <http://www.sbcancer.org.br/alguns-numeros-do-cancer-no-brasil-e-no-mundo/>. Acessado em 15 de abril de 2018.

ROSSONI, C.; BIANCO, B.; RIZZO, M. D. F. V.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARBOSA, C. P. Prevalência de amenorreia em pacientes submetidas a tratamento quimioterápico. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica** v. 8, n. 6, p. 469-472, 2010.

ROTTSCHOLL, R.; HAEGELE, M.; JAINSCH, B. *et. al.* Chronic consumption of *Annona muricata* juice triggers and aggravates cerebral tau phosphorylation in wild-type and MAPT transgenic mice. **Journal of Neurochemistry**. v. 139, p. 624-639, sept. 2016.

SHELLING, A.N. Premature ovarian failure. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**. v. 140, n. 5, p. 633-641, aug. 2010.

SILVA, C. R. L.; SILVA, R. C. L.; VIANA, D. L. **Compacto Dicionário Ilustrado de Saúde**. 2. ed. São Caetano do Sul: Yendis, 2010.

SINGH, R. K.; KUMAR, S.; PRASAD, D. N.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: historic to future perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.151, p. 401-433. apr. 2018.

SINGH, K. L.; DAVIES, M.; CHATTERJEE, R. Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing. **Human Reproduction Update**. v. 11, n. 1, p. 69-89, 2005.

SPARANO, J. A.; WANG, M.; MARTINO, S.; JONES, V.; PEREZ, E. A.; SAPHNER, T.; WOLFF, A. C.; SLEDGE JR., G. W.; WOOD, W. C.; DAVIDSON, N. E. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 358, n. 16, p. 1663-71, apr 2008.

SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H.; SUM, X.; ZHOU, K. Three new anti-proliferative annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, n. 1, p. 2773–2776, 2014.

TAVTIGIAN, S. V.; SIMARD, J.; ROMMENS, J.; COUCH, F.; SHATTUCK- EIDENS, D.; NEUHAUSEN, S. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nature Genetics**. v. 12, p. 333-337, march 1996.

TORRES, M. P.; RACHAGANI, S.; PUROHIT, V.; PANDEY, P.; JOSHI, S.; MOORE, E. D.; JOHANSSON, L.; SINGH, P. K.; GANTI, A. K.; BATRA, S. K. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. **Cancer Letters**. v. 323, n. 1, p. 29-40, oct 2012
THOMPSON, A. M. p53 and breast cancer. **The breast**. v. 2, n. 1, p. 8-10, march 1993.

VIEIRA, S C et al. **Oncologia Básica**. Teresina: Fundação Quixote, 1ª ed., 324 p., 2012.

WALBOOMERS, J. M. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**. v.189, p. 12-9, 1999.

WEGHOFER, A.; FEICHTINGER, W. The forgotten variable: impact of luteinizing hormone on the prediction of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**. v. 85, n. 1, p. 259-261, jan. 2006.

WU; Y.C. Cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. U.S. Patent Application 31/07/2003, Protocolo nº 2003144348-A1.2001.

WOODLOCK, T. J.; LOUGHNER, J.E. **Farmacologia clínica dos agentes antineoplásicos**. In: Rosenthal S, Carignan JR, Smith BD. *Oncologia prática: cuidados com o paciente*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 41-64, 1995.

WOOSTER, R.; BIGNELL, G., LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**. v. 378, n. 6559, p. 789-792, dec. 1995.

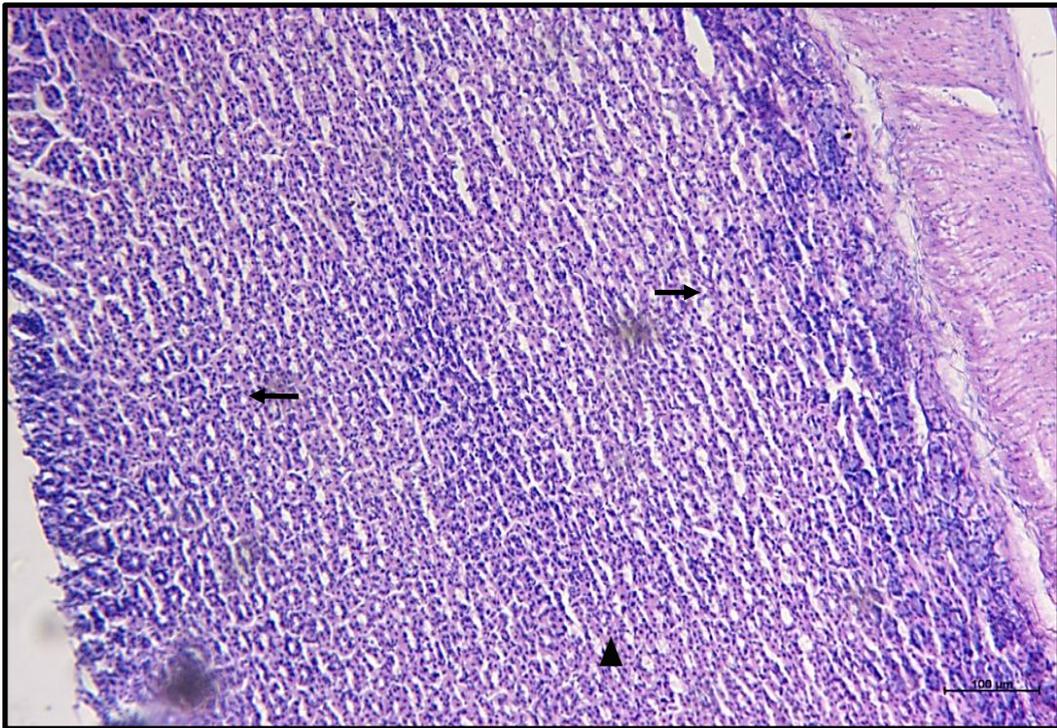
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 2007.

YAMADA, A. M.; MELO, A. L. K. O.; LOPES, G. P.; DE ANDRADE NETO G. B.; MONTEIRO, V. B.; SOARES, R. S. Edema bilateral das mamas secundário a obstrução da veia cava superior e trombose de veia subclávia. **Radiologia Brasileira**. v. 4, n. 46, p. 252-254, jul. 2013.

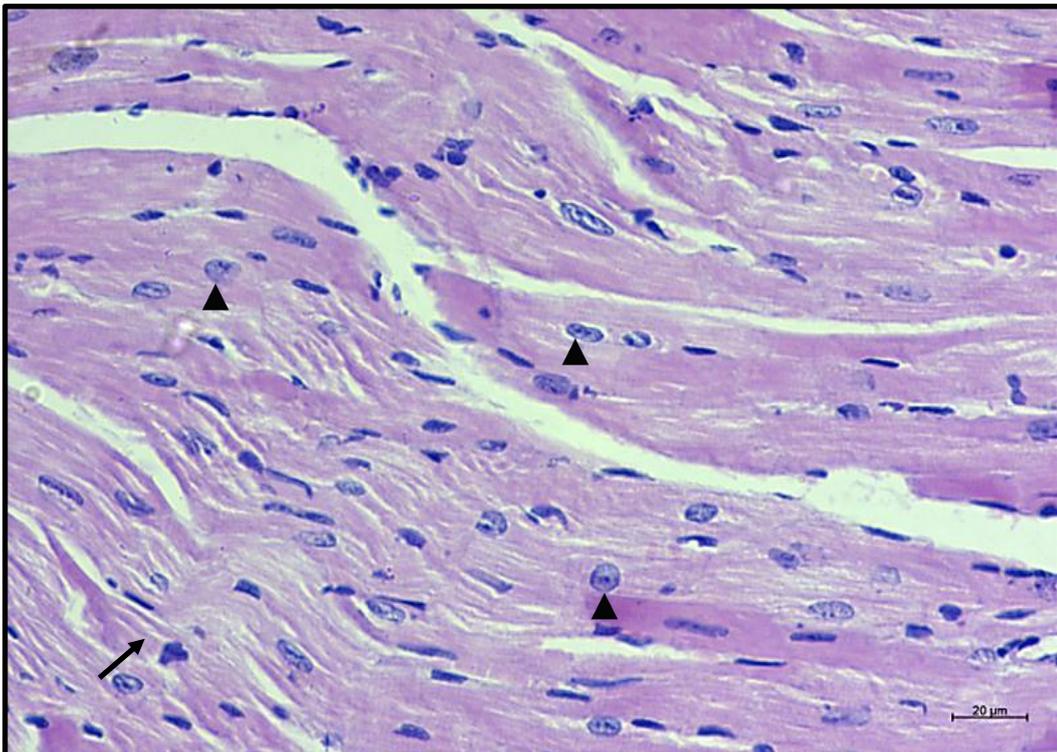
APÊNDICES

A. Fotomicrografia de corte histológico da curvatura maior do estômago mostrando integridade das células da mucosa (seta voltada para esquerda), células parietais (ponta da seta) e células principais (seta voltada para direita). Coloração HE. Escala 100 μm . **B.** Fotomicrografia de corte histológico do coração evidenciando o miocárdio normal (seta) e cardiomiócitos (pontas da seta). Coloração HE. Escala 20 μm .

A

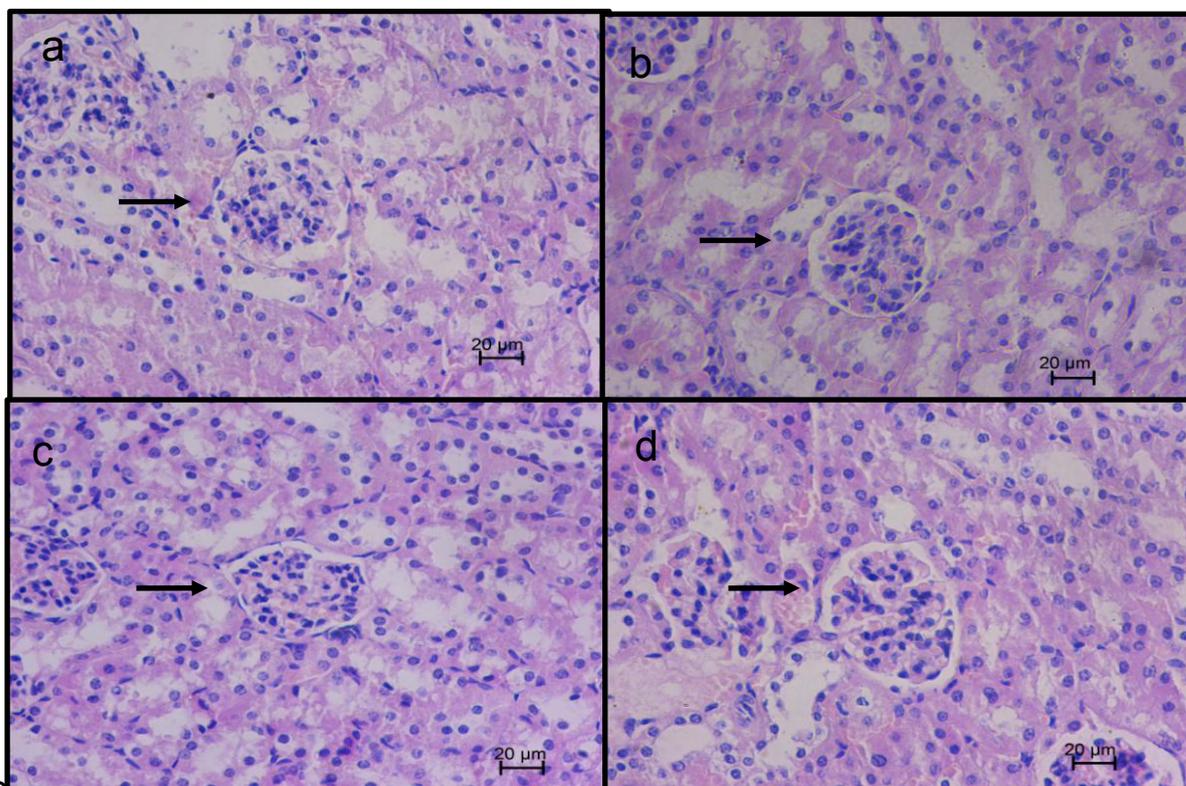


B

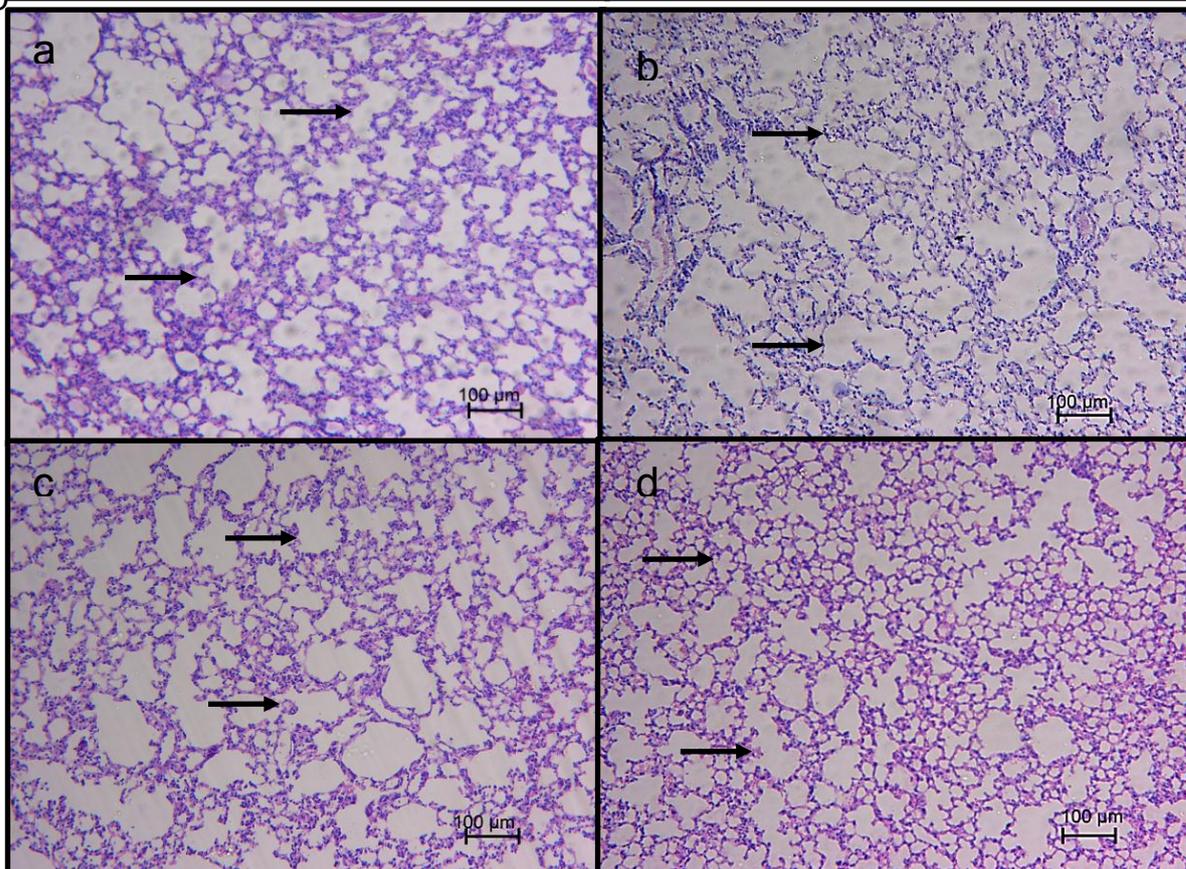


C. Fotomicrografias de corte histológico da porção cortical do rim. Setas indicam glomérulos normais. Coloração HE. Escala 20 μm . **D.** Fotomicrografias de corte histológico de pulmão mostrando estruturas alveolares preservadas. Coloração HE. Escala 100 μm . a) Grupo S; b) grupo C; c) grupo G50; d) grupo G100.

C



D



E. Fotomicrografias de corte histológico de útero preservado. a) Visão geral da secção uterina em corte transversal (escala 200 μ m), b) Secção uterina evidenciando o epitélio uterino (escala 100 μ m). c) Secção uterina mostrando epitélio lumial (escala 20 μ m). A seta indica epitélio lumial. M: miométrio; E: endométrio. Coloração HE.

E

