

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Pedro Martins Bellei

**DESENVOLVIMENTO FETAL EM RATAS WISTAR TRATADAS COM  
IPRIFLAVONA DURANTE A FETOGÊNESE**

Juiz de Fora  
2010

Pedro Martins Bellei

**Desenvolvimento Fetal em ratas Wistar tratadas com ipriflavona durante a  
fetogênese**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Peters

Juiz de Fora

2010

Pedro Martins Bellei

**Desenvolvimento fetal em ratas wistar tratadas com ipriflavona durante a fetogênese**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Maria Peters (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Moreira Chedier  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Valente Borges  
Universidade Tiradentes – Aracaju – SE

*À minha família que esteve sempre ao meu lado, à Marcella pela paciência e amor e aos amigos do Centro de Biologia da Reprodução, minha segunda casa. À vocês meu eterno agradecimento.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, e a minha família, pois sem eles esta jornada não seria cumprida.

A minha namorada Marcella pelo amor, dedicação e principalmente pela paciência.

Ao Centro de Biologia da Reprodução, que desde o momento em que passei a fazer parte desta família, se tornou minha segunda casa.

A minhas orientadoras prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Maria Peters e prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Martha de Oliveira Guerra, que sempre acreditaram em meu potencial, proporcionando grandes oportunidades.

Aos pós graduandos Leda, Roberto, Juliana, Hussen, Eduardo, Rafael por compartilhar os conhecimentos e pelo auxílio nos momentos de dificuldade.

Á todos os funcionários do CBR: Paulinho, Evelise, Lorena, Marcella, Ana Paula, Luís, Flávia, Paulo, Clemilson, Bruno, José Wilson, Luis Carlos, José Carlos, João Carlos, Gilson e Marcos. Todos que possibilitaram a execução do experimento e pela amizade e ótimos momentos de convívio.

Aos estagiários João Gabriel, Fabiana, Julianne, Tatianne, Larissa, Dayana, Thaila, Renato, Grazielle. Pelos intermináveis finais de semana e feriados durante a execução do experimento e pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

A Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos 173/08 e a Rede Mineira de Bioterismo 172/08 – FAPEMIG.

Enfim, a todos, hoje amigos, por que sem vocês não teria alcançado este objetivo.

Muito obrigado!

## RESUMO

A ipriflavona (IP) é uma isoflavona sintética derivada da daidzeína, comercializada com a finalidade de prevenir e/ou tratar a osteoporose. Foi verificado *in vitro* que a IP induziu a apoptose em células epiteliais gástricas e inibiu a proliferação e síntese de DNA de células tumorais óssea. A daidzeína, precursora da IP, teve efeito antiimplantação em ratas e redução da produção de progesterona em células trofoblásticas humanas. A genisteína, estruturalmente semelhante a ipriflavona, exerce efeitos lesivos no blastocisto de camundongos, cultivados *in vitro* e *in vivo*. A fetogênese é um período do desenvolvimento embrionário no qual ocorre intensa mitose e proliferação celular, que caracterizam o crescimento e a diferenciação de vários sistemas orgânicos, de finalização da formação dos sistemas reprodutivo e nervoso central, do desenvolvimento final dos membros e face. Todos esses processos podem ser alterados pelos efeitos da IP, mas não foram encontrados estudos para sua avaliação, sendo o objetivo do presente trabalho avaliar o desenvolvimento fetal em ratas tratadas com solução aquosa de IP durante o período de fetogênese. Foram utilizadas 60 ratas no 1<sup>o</sup> dia pós-coito (pc), mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e ventilação, as quais foram distribuídas, aleatoriamente, em um grupo controle - C (1ml de água destilada) e três tratados T1, T2 e T3 que receberam, respectivamente, 300; 1500 e 3000mg/kg de IP, via intragástrica, nos dias 16 a 20 pc. Os animais foram eutanaziados no 21<sup>o</sup> dia pc. Variáveis analisadas: peso de órgãos maternos (fígado, rim, supra renal, baço e ovário), comprimento e peso corporal fetal, peso de placentas, cérebro, fígado, rins e pulmão fetais. Análise estatística dos dados: ANOVA seguida de teste de Dunnet ( $\alpha = 0.05$ ). O procedimento experimental foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº 024/2008). O tratamento com suspensão aquosa de IP não causou diferença significativa em nenhuma das variáveis estudadas. Podemos concluir que no modelo experimental utilizado, a ipriflavona não causou toxicidade materna e alterações significativas no desenvolvimento fetal.

**Palavras-chave:** Ipriflavona. Fetogênese. Ratos. Gestação. Desenvolvimento.

## ABSTRACT

The ipriflavone is a synthetic derivative of the isoflavone daidzein, marketed with the aim of preventing and / or treating osteoporosis. It was verified in vitro that ipriflavone (IP) induced apoptosis in gastric epithelial cells and inhibited proliferation and DNA synthesis of bone tumor cells. The daidzein, the precursor of ipriflavone, had anti-implantation effect in rats and reduced production of progesterone in human trophoblast cells. Genistein is structurally similar to ipriflavone, has harmful effects on the blastocysts of mice, cultured in vitro and in vivo. The fetogenesis is a period of embryonic development in which there is intense mitosis and cell proliferation, which characterize the growth and differentiation of various organ systems, finishing the formation of reproductive system and central nervous systems of final development of the limbs and face. All these processes can be altered by the effects of ipriflavone, but there are no studies to assess them, the purpose of this study was to evaluate fetal development in rats treated with aqueous solution of Ipriflavone during the fetogenesis. 60 rats were used at 10 days post-coitus (pc), maintained under controlled temperature, humidity and ventilation, which were randomly distributed in one control group - C (1 ml of distilled water) and three treated groups T1, T2 and T3 that received, respectively, 300, 1500 and 3000mg/kg of ipriflavone, intragastric, from 16 to 20 pc. The animals were euthanized at 21<sup>o</sup> days pc. Variables analyzed: maternal organ weights (liver, kidney, supra kidney, spleen and ovary), length and fetal body weight, weight of placenta, brain, liver, kidney and lung. Statistics gathering data analysis: ANOVA followed by Dunnett test ( $\alpha = 0.05$ ). The experimental procedure was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Federal University of Juiz de Fora (Protocol No. 024/2008). Treatment with aqueous suspension of ipriflavone caused no significant difference in any of the variables studied. We can conclude that in the experimental model used, the ipriflavone did not cause maternal toxicity and significant changes in fetal development.

**Keywords:** Ipriflavone. Fetogenesis. Rats. Pregnancy. Development.



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Principais efeitos adversos provocados por agentes teratogênicos durante os diferentes estágios do desenvolvimento.....19
- FIGURA 2 Esquema demonstrativo da similaridade entre estrogênio isoflavona.....24
- FIGURA 3 Estrutura química da daidzeína, genisteína e gliciteína.....26
- FIGURA 4 Consumo (g) diário de ração durante a prenhez de ratas dos grupos controle e tratados 1, 2 e 3 (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).....36
- FIGURA 5 Peso corporal (g) durante a prenhez de ratas dos grupos controle e tratados 1, 2 e 3 (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).....37

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Peso do fígado, rins, supra-renal, baço e ovários das ratas dos grupos controle e tratados (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).....38
- TABELA 2 Análise bioquímica do sangue das ratas prenhes dos grupos controle e tratados (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona, via oral,respectivamente).....39
- TABELA 3 Hemograma de ratas controle e tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).....40
- TABELA 4 Peso médio da ninhada e das placentas de ratas controle e tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).....41
- TABELA 5 Tamanho (cm) de fetos do sexo feminino e peso (mg) dos órgãos fetais de animais controle e tratados com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).....42
- TABELA 6 Tamanho (cm) de fetos de sexo masculino e peso (mg) dos órgãos fetais de animais controle e tratados com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente) .....43

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 Desenvolvimento Embrionário e Fetal.....	16
2.1.1 <i>Pré-implantação</i> .....	16
2.1.2 <i>Implantação</i> .....	17
2.1.3 <i>Pós-implantação</i> .....	17
2.2 Avaliação dos efeitos tóxicos sobre a reprodução .....	19
2.3 Produtos Terapêuticos derivados de plantas medicinais .....	21
2.4 Flavonóides .....	23
2.4.1 <i>Isoflavonas</i> .....	23
2.5 Ipriflavona.....	27
2.5.1 <i>Identificação</i> .....	27
2.5.2 <i>Efeitos terapêuticos</i> .....	27
2.5.3 <i>Mecanismo de ação</i> .....	27
2.5.4 <i>Farmacocinética</i> .....	28
2.5.5 <i>Efeitos colaterais</i> .....	29
2.5.6 <i>Estudos na reprodução</i> .....	29
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>30</b>
<b>4 OBJETIVO</b> .....	<b>31</b>
4.1 Objetivo geral .....	31
4.2 Objetivos específicos .....	32
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
5.1 Modelo experimental .....	32
5.2 Condições de criação e de alojamento .....	33
5.3 Acasalamento e organização dos grupos experimentais .....	33
5.4 Variáveis observadas .....	34
5.4.1 <i>Maternas</i> .....	34
5.4.2 <i>Fetais</i> .....	35
5.6 Procedimento estatístico .....	35
5.7 Comitê de Ética na Experimentação Animal .....	36
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>

6.1 Dados maternos .....	36
6.2 Dados relativos aos fetos .....	41
REFERÊNCIAS .....	45
APÊNDICE .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário em mamíferos pode ser dividido em embriogênese inicial, organogênese e fetogênese. A fetogênese compreende o período final do desenvolvimento embrionário, onde se encerra a formação do sistema nervoso e ocorre crescimento fetal. Neste período, a exposição a agentes tóxicos dificilmente causa malformações, embora possa causar lesões no sistema nervoso central, genitais externos e retardo de crescimento intrauterino (MOORE e PERSAUD, 2004).

Dentre os agentes tóxicos que podem afetar o desenvolvimento fetal, podemos relacionar drogas em geral, poluentes do meio ambiente, medicamentos e outros. Nos últimos anos registrou-se um aumento expressivo na utilização de fitoterápicos por parte da população na tentativa de minimizar os efeitos adversos que possam ocorrer com o tratamento medicamentoso convencional (EISENBERG et al., 1998).

Em contrapartida, o aumento do consumo destas substâncias também foi seguido por um crescimento da divulgação de artigos e reportagens médicas em revistas, jornais e telejornais com propósito tanto informativo quanto comercial, destinado à venda de novos produtos ou serviços. Mas nem sempre a população tem acesso às melhores informações a respeito dessas substâncias, não sabendo os riscos potenciais a que estão expostos (BONEVSKI et al., 2008). Uma alternativa para minimizar os agravos seria o aumento no número de pesquisas sobre essas substâncias para a formação de uma base de dados sólida para informação tanto por parte dos pacientes como para profissionais da saúde (JOOS et al., 2008).

Entre os fitoterápicos mais utilizados por mulheres, encontram-se aqueles usados para problemas menstruais, sintomas da menopausa, alterações do humor e para doenças ósseas (TESCH, 2003). Muitos dos efeitos obtidos estão relacionados aos flavonóides presentes na composição desses fitoterápicos, que também possuem atividade anticarcinogênica, antiviral, antioxidante e antiinflamatória (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; HAVSTEEN, 2002).

As isoflavonas representam uma classe de flavonóides conhecidas como fitoestrógenos (GARRIDO et al., 2003) por apresentarem estrutura química semelhante ao estradiol e ação estrogênica. São comercializadas hoje em dia com a finalidade de prevenir e/ou tratar doenças como neoplasias, osteoporose, distúrbios cardiovasculares e outros, principalmente associados ao climatério (GARRIDO et al., 2003; BONILLA, 2004).

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona) é uma isoflavona sintética derivada da daidzeína, encontrada em grãos de soja e derivados, sendo comercializada com a finalidade de prevenir e/ou tratar a osteoporose (GARRIDO et al., 2003; BONILLA, 2004; PINTO et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

Foi verificado *in vitro* que a ipriflavona (IP) induziu a apoptose em células epiteliais gástricas (TANI et al., 2004) e inibiu a proliferação e síntese de DNA de células tumorais ósseas (IWASAKI, 2002). Em estudos prévios, ainda não publicados, realizado por Fernandes (2008), foi observado que a ipriflavona exerceu efeito antiimplantação em blastocistos de ratas Wistar.

Estudos com a daidzeína, precursora da ipriflavona, mostram efeito antiimplantação em ratas (WU et al., 2005) e redução da produção de progesterona em células trofoblásticas humanas (RICHTER et al., 2009). Também se sabe que a genisteína, estruturalmente semelhante a ipriflavona, exerce efeitos lesivos no blastocisto de camundongos, cultivados *in vitro* (induz a apoptose, diminui o número de células, retarda o desenvolvimento pós-implantação e aumenta incidência de morte precoce de blastocistos) e *in vivo* (CHAN et al., 2007).

Sendo a fetogênese um período do desenvolvimento embrionário caracterizado por intensa mitose e proliferação celular e onde a apoptose é extremamente importante para o remodelamento na formação de órgãos e tecidos de sistemas fetais (WOLPERT, 1998; MOORE e PERSAUD, 2004), a IP poderia interferir no desenvolvimento fetal, causando retardo de crescimento intra-uterino, que freqüentemente ocorre em fetos cujas mães foram expostas a xenobióticos no período de fetogênese (CHRISTIAN, 2001; MANSON et al., 1994).

Dada a grande utilização da IP na prevenção de osteoporose (PINTO et al., 2006; ZHANG et al., 2009); a escassez de informações a respeito do seu

efeito na reprodução; o efeito apoptótico (TANI et al., 2004) e inibidor da síntese de DNA (IWASAKI, 2002); e considerando que a daidzeína, precursora da IP, diminui a produção de progesterona (RICHTER et al., 2009) fica evidente a necessidade de estudar o efeito da IP no desenvolvimento fetal. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento fetal em ratas tratadas com solução aquosa de IP durante o período de fetogênese, visando fornecer subsídios para avaliação do risco de seu uso em seres humanos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão da literatura serão abordadas as três etapas do desenvolvimento embrionário em mamíferos: Pré-implantação, Implantação e Pós-implantação. Em seguida apresenta-se uma breve revisão dos testes relacionados à toxicidade reprodutiva, e sobre cuidados e utilização dos fitoterápicos. Finalmente, foram descritas as características farmacológicas, usos terapêuticos e ações fisiológicas da ipriflavona, assim com sua relação na reprodução e no desenvolvimento embrionário.

### 2.1 Desenvolvimento Embrionário e Fetal

O desenvolvimento embrionário em mamíferos compreende o período que vai desde a fecundação até o nascimento. Este período pode ser dividido em três fases, compreendendo a Pré-implantação, Implantação e Pós-implantação.

#### 2.1.1 *Pré-implantação*

O desenvolvimento embrionário inicia-se na fertilização, quando os pronúcleos masculino e feminino se unem para formar o zigoto. O contato entre o espermatozóide e o oócito ocorre normalmente no terço distal da tuba uterina e à medida que o zigoto passa pela tuba em direção ao útero, sofre sucessivas divisões mitóticas originando os blastômeros. Estes blastômeros dão origem a mórula, uma estrutura formada de 12 a 14 blastômeros (MOORE e PERSAUD, 2004). Na mórula, os blastômeros começam a secretar fluido e aos 64 blastômeros, estabelece-se o início de uma cavidade, a blastocèle,



sendo esta fase chamada de blastocisto inicial (DUMM, 2006). Esta mudança coincide com a entrada do blastocisto no útero.

### 2.1.2 *Implantação*

A implantação inicia-se quatro a cinco dias após a fertilização; a zona pelúcida desaparece e o trofoblasto adjacente ao embrioblasto se adere ao epitélio endometrial, com isso, o blastocisto humano está superficialmente implantado ao endométrio ao fim da primeira semana, e completa-se durante a segunda semana de desenvolvimento (MOORE e PERSAUD, 2004). Em ratos o embrião está totalmente implantado por volta do sétimo ao oitavo dia (ACOSTA, 1994).

### 2.1.3 *Pós-implantação*

O período de pós-implantação pode ser dividido em duas fases: organogênese e fetogênese.

#### *Organogênese*

A organogênese compreende a fase do desenvolvimento embrionário em mamíferos onde as estruturas estão em diferenciação e são mais sensíveis a agentes teratogênicos. A organogênese em ratos ocorre entre os dias oito e 16 de prenhez. Durante o período de organogênese os riscos de malformação são grandes, considerando que os esboços de órgãos e sistemas se desenvolvem e se completam nesse período. Agentes tóxicos que atingem os embriões durante essa fase do desenvolvimento podem causar desde a morte do concepto a malformações maiores, dependendo da fase do desenvolvimento e da sensibilidade do órgão (WOLPERT, 1998; MOORE e PERSAUD, 2004). No processo de organogênese ocorrem:

Crescimento (aumento do tamanho) – divisão celular e elaboração de produtos;

Morfogênese – movimentação de massas celulares, interações entre núcleo e citoplasma e entre célula e célula que promovem a organização de tecidos em órgãos;

Diferenciação – maturação dos processos fisiológicos que resultam na formação de tecidos e órgãos. Tais mecanismos de desenvolvimento não ocorrem separadamente, eles se justapõem. O desenvolvimento das estruturas externas e internas do embrião acontece nesta fase, entretanto o funcionamento dos órgãos e tecidos ainda é mínimo, com exceção do sistema cardiovascular (LEMONICA, 1996; MOORE e PERSAUD, 2004).

### *Fetogênese*

O desenvolvimento durante o período fetal envolve basicamente o rápido crescimento do corpo e a diferenciação dos órgãos, tecidos e sistemas. Neste período, o ganho de peso e o crescimento corporal são muito grandes. (MOORE e PERSAUD, 2004).

As características mais marcantes deste período são: histogênese, maturação funcional e crescimento. A exposição a teratógenos leva a efeitos adversos que se manifestam como retardo de crescimento ou desordens funcionais, mas os fetos são mais resistentes à morte que os de estágios anteriores. No período de fetogênese os agentes tóxicos causam poucas malformações, mas podem induzir o desenvolvimento de órgãos hipotrofiados, hipofuncionais e os fetos, como um todo, podem ter deficiência no crescimento, caracterizada pelo que se denomina de retardo de crescimento intrauterino (CHRISTIAN, 2001).

O desenvolvimento normal fetal e de suas estruturas é determinado por uma complexa relação entre fatores genéticos, imunológicos, endócrinos, nutricionais e vasculares. Qualquer distúrbio em qualquer desses fatores pode causar alteração no desenvolvimento e crescimento fetal (CAMPBELL, 1976).

A Figura 01 ilustra os efeitos causados por agentes teratogênicos em diferentes fases do desenvolvimento.

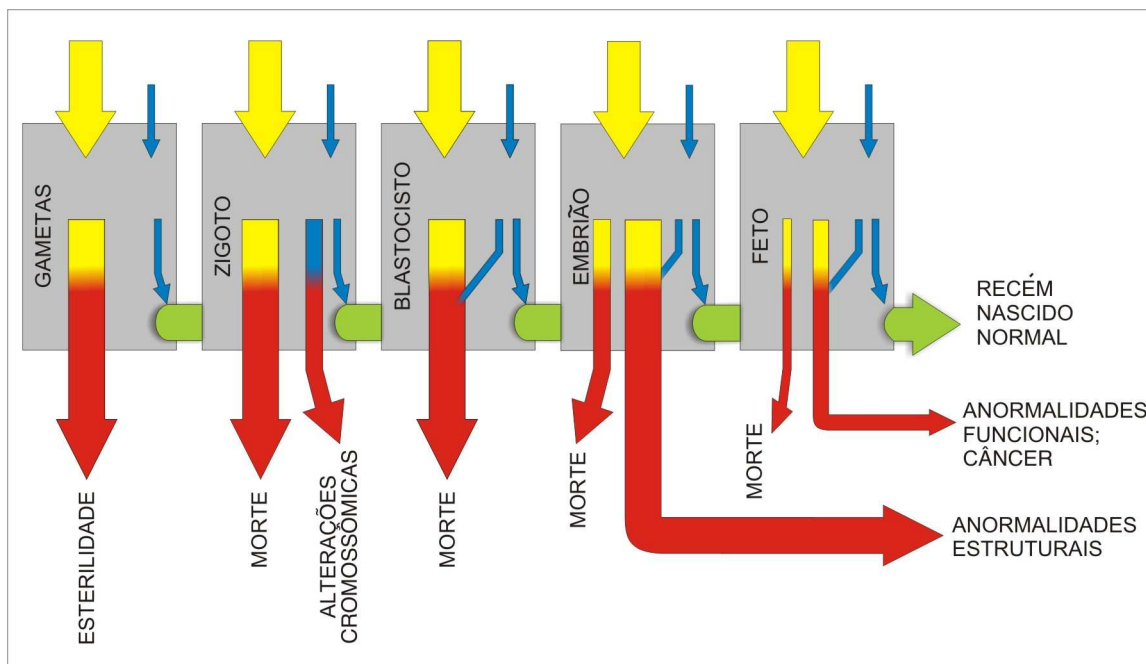


FIGURA 1 - Principais efeitos adversos provocados por agentes teratogênicos durante os diferentes estágios do desenvolvimento. Setas amarelas (largas) indicam ação teratogênica forte, setas azuis (estreitas) indicam ação teratogênica branda. As setas vermelhas indicam os efeitos adversos causados por um agente, e sua largura indica a intensidade com que a resposta pode ocorrer. A seta verde indica o desenvolvimento embriofetal normal.

FONTE: Adaptado de CATALANO et al., (1993).

## 2.2 Avaliação dos efeitos tóxicos sobre a reprodução

Os estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva consistem em ensaios realizados em animais, a fim de verificar o potencial de uma substância química nova provocar efeitos adversos sobre o processo reprodutivo, incluindo a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embriofetal, o parto, e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade reprodutiva (ICH, 2001; PINTO, 2005). É uma das áreas mais complexas da Toxicologia Preditiva, porque o ciclo reprodutivo prolonga-se por boa parte da vida do indivíduo, iniciando-se com a produção de gametas nos pais (ainda no período pré-natal), seguindo pela fertilização e desenvolvimento embriofetal,

nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual quando os descendentes, já adultos, tornam-se capazes de procriar.

Os testes reprodutivos foram padronizados através de uma conferência internacional – ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), em que participaram países da União Européia, Japão e Estados Unidos. Estes testes podem ser subdivididos nos seguintes estágios:

1. *Maturação sexual à concepção.* Avaliam-se as funções reprodutivas de machos e fêmeas adultas, o desenvolvimento e maturação de gametas, o comportamento sexual e o processo de fertilização.

2. *Concepção à implantação.* São estudadas as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento pré-implantação e o período de implantação propriamente dito.

3. *Implantação ao fechamento do palato duro.* As funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento embrionário e a formação dos principais órgãos são os objetivos de estudo nesse estágio.

4. *Fechamento do palato duro ao final da gestação.* Avaliam-se aqui as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento e crescimento fetal e o desenvolvimento e crescimento dos órgãos fetais.

5. *Nascimento ao desmame.* Alvo de estudo: função reprodutora de fêmeas adultas, adaptação neonatal à vida extra-uterina, desenvolvimento pré-desmame e crescimento.

6. *Desmame a maturidade sexual.* Investigam - se as ações toxicológicas dos produtos durante o desenvolvimento e crescimento pós-desmame, adaptação das crias à vida independente até atingir a maturidade sexual.

Embora esses estágios nos estudos toxicológicos não sejam obrigatórios, procura-se segui-los como forma de uniformização de estudos pré-clínicos.

### 2.3 Produtos Terapêuticos derivados de plantas medicinais

A biodiversidade pode oferecer uma ampla gama de produtos de importância terapêutica, dentre eles destacam-se os fitoterápicos e os fitofármacos.

Fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais e os fitofármacos são substâncias extraídas de plantas que contêm o princípio ativo isolado, apresentando atividade(s) farmacológica(s) podendo, ter aplicação terapêutica (Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA), (GUERRA e NODARI, 2004).

A idéia principal na utilização de fitoterápicos e fitofármacos na medicina humana é aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde, ofertando medicamentos equivalentes, registrados, mais acessíveis, com espectros de ação mais adequados e com indicações terapêuticas complementares às existentes (LAPA et al., 2004; EISENBERG et al., 1998).

Entre os adeptos da fitoterapia, é comum a idéia de que as plantas medicinais tradicionalmente usadas já foram testadas e homologadas pelo seu uso prolongado. Por isso são erroneamente considerados remédios eficazes e seguros, sem efeitos colaterais comuns aos medicamentos sintéticos, não necessitando avaliação exigida para os medicamentos.

Estudos mostram que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta US\$320 bilhões/ano, sendo que US\$20 bilhões são originados de substâncias derivadas de plantas (ROBBERS et al., 1996). O de drogas de origem vegetal é estimado em US\$12,4 bilhões, sendo a Europa responsável por 50% deste mercado. Nos países desenvolvidos, fitoterápicos e fitofármacos são responsáveis por 25%, enquanto nos países em desenvolvimento são responsáveis por 80% da utilização (LAPA et al, 2004).

No Brasil, estimativas de 1997 a 2000 o colocam no 7º lugar mundial, com vendas de medicamentos atingindo 11,5 bilhões de dólares, o que corresponde a um consumo *per capita* de apenas 61 dólares por ano (USDC, 1999).

Apesar do alto consumo de medicamentos no Brasil, estes produtos atendem apenas a faixa de população economicamente ativa (cerca de 30%). Estes dados mostram que os restantes 130 milhões de habitantes utilizam produtos não registrados, demonstrando que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais e seus derivados para tratar seus males (LAPA et al., 2004).

A planta medicinal utilizada como medicamento é um produto estranho introduzido no organismo com finalidades terapêuticas (LAPA et al., 2004). O uso popular e tradicional não é suficiente para validar como medicamentos eficazes e seguros, e a preconização destes produtos deve ser fundamentada em experiências comprobatórias assim como é feito para qualquer medicamento sintético (BRASIL, 1995).

Segundo a Resolução RDC nº 48 (ANVISA, 2008), a eficácia e segurança dos fitomedicamentos é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos na fase 3.

Apesar de três ou quatro décadas de estudo, pode se dizer que até esta data não houve um processo coordenado entre os atuantes neste processo (indústria, farmacólogos, fitoquímicos, químicos de síntese, toxicólogos, investigadores clínicos etc) (FERREIRA, 1997). Na sua maioria, os estudos buscavam comprovar a validade do uso popular de plantas medicinais. Porém, a população nem sempre tem acesso às informações a respeito dessas substâncias, não sabendo os riscos potenciais a que estão expostas (BONEVSKI et al., 2008).

Os estudos voltados para a toxicologia e farmacologia pré-clínicos têm a finalidade de avaliar a eficácia e a segurança dos medicamentos em geral e, constituem o fundamento para uma base de dados sólida para a informação tanto por parte dos pacientes como para profissionais da saúde (JOOS et al., 2008).

## 2.4 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis (possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados ou seus derivados funcionais) presente em abundância nos metabólitos secundários dos vegetais. Estas substâncias representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, sendo amplamente distribuída no reino vegetal (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004).

Os flavonóides podem ser encontrados em diversas formas estruturais, entretanto, a maioria possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Atualmente são conhecidos mais de 4200 flavonóides diferentes (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004).

Entre as principais funções atribuídas aos flavonóides podemos citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra insetos, fungos, bactérias e vírus; atração de polinizadores; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos; e inibidores de enzimas (HARBONE, 1988; HARBONE e WILLIAMS, 2000). Normalmente os flavonóides não são considerados substâncias tóxicas, mas não existem estudos na literatura científica para comprovar esta afirmação. Segundo Trueba e Sanchez (2001), doses elevadas podem induzir danos ao DNA.

Os flavonóides também apresentam grande importância devido às propriedades farmacológicas atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras.

Os flavonóides foram agrupados em classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas conforme descrito adiante (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004).

### 2.4.1 Isoflavonas

As concentrações de isoflavonas são relativamente maiores nas leguminosas e, em particular, na soja. É uma classe de flavonóides de

ocorrência exclusiva na família botânica Fabaceae, salvo raríssimas exceções (SETCHELL, 1998).

Apesar de estarem restritas a uma família botânica, apresentam diversidade estrutural importante, sendo encontradas estruturas ciclizadas como os pterocarpanos, cumestanos e cumaronocromonas. Em vegetais, as isoflavonas podem se comportar como substâncias induzidas, que são produzidas pelas plantas em resposta à infecção por agente patogênico.

As isoflavonas apresentam quatro propriedades biológicas importantes: atividade antifúngica e antibacteriana, propriedade inseticida e atividade estrogênica (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004).

Na natureza, as isoflavonas encontram-se na forma glicosilada (ligadas a uma molécula de açúcar), biologicamente inativa. Após a ingestão ocorre um complexo mecanismo enzimático de conversão no trato gastrointestinal, resultando na formação de fenóis heterocíclicos estruturalmente parecidos ao 17- $\beta$  – estradiol, que lhe conferem atividade semelhante ao estrogênio na maioria dos sistemas biológicos (YAMAZAKI, 1985; MACKEY e ÉDEN, 1998; SETCHELL, 1998 ; FERRARI e DEMIATE, 2001, GARRIDO et al., 2003).

Dentre os dois tipos majoritários de receptores de estrógeno (RE), chamados de  $\alpha$  (encontrados no tecido epitelial mamário e uterino) e  $\beta$  (tecido ósseo e epitélio ovariano) (DIEL, 2002; FRASOR et al., 2003; POWER e THOMPSON, 2003), as isoflavonas se ligam mais fortemente aos receptores estrogênicos  $\beta$  dos que aos  $\alpha$ . A afinidade da genisteína aos receptores é comparável a do 17 beta-estradiol (MORITO et al., 2001).

A FIGURA 2 mostra a semelhança estrutural entre estrogênio e a isoflavona equol.



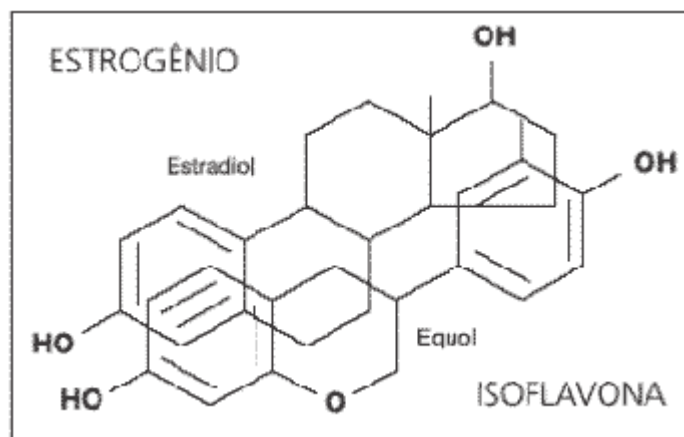


FIGURA 2. Fórmulas estruturais do estrogênio e da isoflavona equol, evidenciando sua similaridade.

Fonte: <http://www.medicinacomplementar.com.br/tema271106.asp>

As isoflavonas apresentam uma grande variedade estrutural química: somente a soja contém três tipos de isoflavonas com quatro formas isoméricas, totalizando 12 diferentes tipos dessa substância. As formas que têm recebido maior atenção nas pesquisas e que têm se mostrado mais ativas são a daidzeína, genisteína e gliciteína (DEWICK, 1994; CHANG, 2002).

### *Genisteína*

A genisteína possui efeito estrogênico e inibe várias enzimas envolvidas em processos de carcinogênese. As populações orientais, que apresentam baixa incidência de câncer de mama e próstata, consomem de 28-80mg de genisteína por dia, quase toda derivada de produtos de soja, enquanto que a ingestão diária de genisteína nos EUA é somente de 1-3 mg/dia (WEI et al., 1995). Zava e Duwe (1997) sugerem que a genisteína é a única isoflavona que possui efeito potencial na inibição do crescimento de células cancerosas em concentrações fisiológicas. A genisteína funcionaria como potente inibidor da oncogênese (BARNERS et al., 1995; PETERSON, 1995), pois inibe a tirosina quinase (PTK), o fator de crescimento epidérmico (EGF-R), as DNA topoisomerasas I e II, a quinase ribossômica S6, assim como a angiogênese e a diferenciação celular *in vivo*. Além disso, inibiria a produção de radicais livres,

modularia o ciclo celular e, eventualmente, poderia precipitar a apoptose (BARNES et al., 1995).

### *Daidzeína*

A daidzeína é, junto com a genisteína, o fitoestrógeno mais abundante nos derivados de soja. Tovar e Acosta (2004) encontraram que a daidzeína é mais eficiente que a genisteína na prevenção de perda óssea de ratas ovariectomizadas. Enquanto a genisteína é a isoflavona que apresenta maior semelhança com o estrógeno endógeno, apresentando efeito estrogênico, a daidzeína parece exercer maior ação antiestrogênica (PICHERIT et al., 2000).

### *Gliciteína*

A gliciteína é a isoflavona menos abundante encontrada nos alimentos de soja, e também a menos estudada. A estrutura química da gliciteína é parecida àquela da genisteína e da daidzeína, e esperava-se que a gliciteína apresentasse atividades fisiológicas similares. No entanto, à exceção da atividade antioxidante evidenciada em poucos estudos, isto não pode ser afirmado (SONG et al., 1999; ZHANG et al., 1999). Alguns estudos apontam que a gliciteína tem fraca atividade estrogênica quando medida *in vivo* e *in vitro*. No entanto, o mecanismo de ação da gliciteína ainda não está claro (SONG et al., 1999; ZHANG et al., 1999).

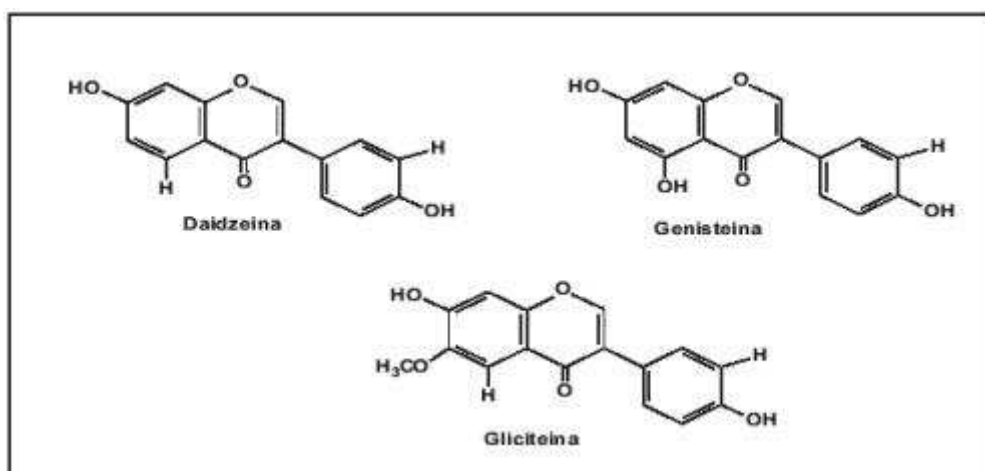


FIGURA 3. Estrutura química da daidzeína, genisteína e gliciteína.

Fonte: [http://www.cnpma.embrapa.br/cad\\_fotos/283.jpg](http://www.cnpma.embrapa.br/cad_fotos/283.jpg)

## 2.5 Ipriflavona

### 2.5.1 Identificação

A ipriflavona (IP) (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona) é uma isoflavona sintética derivada da daidzeína, sendo um fitofármaco comercialmente vendido sob o nome de Osteoplus<sup>®</sup>. Estudos experimentais demonstram que a IP possui fraca atividade estrogênica (CECCHINI et al., 1997; CIVITELLI, 1997), ao contrário da genisteína, onde sua afinidade por receptores  $\beta$  é comparável ao 17- $\beta$ -estradiol (MORITO et al., 2001).

### 2.5.2 Efeitos terapêuticos

A IP é comercializada com a finalidade de prevenir e/ou tratar doenças como neoplasias, osteoporose, distúrbios cardiovasculares e outros, principalmente associados ao climatério. Sua principal indicação clínica é para o tratamento e prevenção da osteoporose (YAMAZAKI, 1985; HEAD, 1999; CHAMBÔ FILHO et al., 2000; FERRARI e DEMIATE, 2001; GARRIDO et al., 2003; BONILLA, 2004; PINTO et al., 2006; ZHANG et al., 2009) sendo utilizada sob a proposta de aumentar a densidade e prevenir a perda óssea (YAMAZAKI, 1985; HEAD, 1999; CHAMBÔ FILHO et al., 2000; ZHANG et al., 2009).

### 2.5.3 Mecanismo de ação

A IP é utilizada para tratar a osteoporose por inibir a reabsorção óssea, através da estimulação da atividade dos osteoblastos e pela inibição da formação de novos osteoclastos e inibição da ativação de osteoclastos maduros. Fato comprovado por estudos *in vitro* (BONUCCI et al., 1992) e *in vivo* (NOTOYA et al., 1993; TSUTSUMI et al., 1994, IWASAKI, 2002).

Foi verificado que além da IP, seus metabólitos também inibem a reabsorção óssea. Um estudo “*in vitro*” em ossos longos do feto de rato verificou que todos os seus metabólitos foram capazes de inibir a reabsorção óssea estimulada pela paratireóide (BONUCCI et al., 1992).

A IP também apresentou resultados positivos sobre a formação da maxila de ratos (MAKI et al., 2005) e inibiu a reabsorção do osso recém-formado num estudo sobre regeneração óssea (ITO et al., 2007)

Um estudo *in vitro* demonstrou que a ipriflavona inibe a proliferação e a síntese de DNA de células tumorais ósseas MDA-231 e que a ipriflavona não só inibiria o crescimento dessas células tumorais como também reduziria os osteoclastos, evitando assim desprendimento da massa óssea tumoral e metástases ósseas osteolíticas (IWASAKI, 2002). Porém, existem estudos onde a IP não apresentou efeito de proteção da massa óssea:

- Usuárias de um preparado de IP, na dose de 200mg três vezes ao dia, durante quatro anos, não apresentaram aumento da densidade mineral óssea (ALEXANDERSEN et al., 2001),
- Em ossos de ratos com concentrações de IP 100 vezes superior a concentração terapêutica, não foi observada alteração na motilidade dos osteoclastos e não houve inibição na reabsorção óssea (AZRIA et al., 1993).

Tais estudos deixam algumas dúvidas sobre a utilidade da IP no tratamento da osteoporose pós-menopausa (ALDRIGHI et al., 2001).

#### 2.5.4 Farmacocinética

A dose terapêutica diária recomendada da ipriflavona é de 600mg/kg/dia, comercializado sob a forma de cápsulas, nas concentrações de 200 e 300mg/kg/dose, sendo administrado, respectivamente, de 8 em 8 e de 12 em 12 horas (ANVISA, 2008).

A ipriflavona é bem absorvida pelo intestino delgado, fígado e rins, extensivamente metabolizada por oxidação no fígado, resultando em sete metabólitos diferentes (MOON et al., 2007), e excretadas por via biliar, fecal e urinária (YOSHIDA et al., 1985; LEVAI e SZATMARI, 1995). Atinge nível sérico máximo em ratos em 1,5h e possui meia-vida de 5,8h, enquanto que em cães,

o pico sérico é atingido em meia hora. A eliminação dos metabólitos ocorre em 48h em ratos e em 72h em cães (YOSHIDA et al., 1985).

Os metabólitos da ipriflavona possuem efeitos inibitórios sobre as CYPs 1A2, 2C8 e 2C19 (enzimas isomorfas do citocromo P450) (MOON et al., 2007). Também atuam competitivamente com outros fármacos, aumentando os níveis plasmáticos de teofilina, e inibindo competitivamente a isoenzima do citocromo P450, CYP2C9, responsável pela catalisação de outros fármacos, como a varfarina (SCOTT e GARY, 2002).

#### *2.5.5 Efeitos colaterais*

Na análise do hemograma completo de mulheres que tomaram IP durante quatro anos, foi observada linfocitopenia em significativo número delas (ALEXANDERSEN, et al., 2001), fato esse contradito por estudo subsequente (DO Y SOUNG et al., 2006). Porém, em outro estudo do mesmo autor, é sugerido que a ingestão moderada de IP e outras isoflavonas da soja, não só não causaria linfocitopenia, como também corrigiria a leucocitose resultada de deficiências hormonais ovarianas típicas da menopausa (DO Y SOUNG et al., 2004).

Sérios efeitos colaterais gastrointestinais também têm sido relatados com usuárias de IP (MATSUOKA et al., 1998). O estudo *in vitro* de Tani et al. (2004), com células epiteliais gástricas, verificou que esses desconfortos são causados por ação apoptótica da ipriflavona, e não por seu possível efeito estrogênico.

#### *2.5.6 Estudos na reprodução*

Até o presente momento na literatura consultada, não existem estudos sobre a ação da IP no processo reprodutivo e desenvolvimento embrionário, embora o produto seja amplamente utilizado por mulheres.

Em trabalho recente, ainda não publicado, realizado no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora por

Fernandes (2008), a administração de IP a ratas prenhes durante o período de pré-implantação alterou o desenvolvimento embrionário.

Também foi demonstrado que a genisteína possui efeitos lesivos ao desenvolvimento embrionário: *in vitro* foi verificado que esta isoflavona induz a apoptose, diminui o número de células, retarda o desenvolvimento pós-implantação e aumenta morte precoce de blastocistos de camundongos e *in vivo* demonstraram que induz apoptose e inibição da proliferação celular do blastocisto (CHAN et al., 2007).

Considerando a semelhança estrutural da ipriflavona com a genisteína (fig. 3); que a IP inibe a proliferação e a síntese de DNA de células tumorais ósseas (IWASAKI et al., 2002); que possui efeito apoptótico (TANI et al., 2004), mecanismo de ação que potencialmente podem interferir no crescimento e desenvolvimento fetal, a escassa publicação de estudos da IP na reprodução, torna-se necessário a avaliação da toxicidade da ipriflavona no período da fetogênese, quando os processos de proliferação e diferenciação celular são essenciais para o desenvolvimento fetal adequado.

### 3 HIPÓTESE

A suspensão aquosa de ipriflavona causa efeito tóxico no desenvolvimento fetal de ratos Wistar.

## **4 OBJETIVO**

### 4.1 Objetivo geral

- Avaliar o desenvolvimento de ratos Wistar expostos a suspensão aquosa de ipriflavona no período de fetogênese.

## 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos da suspensão aquosa de ipriflavona através das alterações clínico-laboratoriais maternas.
- Avaliar as alterações no desenvolvimento e crescimento de fetos de ratas Wistar tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Modelo experimental

Foram usadas obtidas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) com  $180 \pm 15$  g de peso, nulíparas e nuligestas, com três meses de idade, obtidas na colônia do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) – Universidade Federal de Juiz de Fora. Durante o experimento os animais foram alojados individualmente em microisoladores Alesco®, com temperatura de 22°,



umidade relativa de 50-60% e 12h de ciclo claro/escuro. Os animais recebiam 25g de ração comercial Nuvilab® por dia e água *ad libitum*.

## 5.2 Condições de criação e de alojamento

Os animais foram mantidos em *racks* (fotoperiodicidade, ventilação, temperatura e umidade do ar, controlados automaticamente), acondicionados em microisoladores, providos de camas de maravalha selecionada, mamadeira para água filtrada e cocho para ração do tipo peletizada. Em média cada rata prenhe recebeu 25g de ração por dia, enquanto a água era oferecida *ad libitum*. Os alojamentos são providos de iluminação mista, fornecida por lâmpadas incandescentes e janelas. A temperatura é mantida constante (23°C) através de ar condicionado e as luzes são programadas para se acenderem às 6:00 e apagarem às 18:00h, compreendendo um fotoperíodo de 12h de luz e 12hs de escuro, considerado ideal para o rato, segundo Wolfensohn e Lloyd (1998).

## 5.3 Acasalamento e organização dos grupos experimentais

Os animais foram acasalados no sistema poligâmico, com machos de fertilidade previamente comprovada, ao final da tarde (17:00h), na proporção de três fêmeas por macho. Na manhã seguinte, identificaram-se os animais inseminados pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, sendo este dia designado o dia 1 pós-coito (p.c.) (KATO et al., 1979).

Comprovada a inseminação, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, cada grupo contendo 15 animais: Tratados I, II e III e Controle. Os grupos Tratados I, II e III receberam, respectivamente, via intragástrica, duas vezes ao dia (7 e 19h), 1mL de suspensão aquosa de ipriflavona, nas doses de 300, 1500 e 3000mg/kg/dose (dose terapêutica, 5 vezes e 10 vezes a dose indicada). As ratas do grupo Controle receberam, pelo mesmo esquema, 1mL de água destilada. Este procedimento foi realizado do 16º ao 20º dia de prenhez, via intragástrica, por gavagem, às 6:00h e 18:00.

## 5.4 Variáveis observadas

### 5.4.1 *Maternas*

As ratas prenhes foram observadas diariamente para a avaliação de sinais clínicos de toxicidade materna (piloereção, hipo ou hipermotilidade no interior da gaiola, estereotipias, cromodacriorreia, diarreia, perdas sanguíneas vaginais e mortes) (CHRISTIAN, 2001).

O consumo materno de ração também foi registrado durante toda a gestação. Para isso foram oferecidos a cada animal, diariamente, sempre no mesmo horário, 25g de ração. No dia seguinte estimou-se o consumo através da diferença de peso entre a sobra da ração encontrada em cada gaiola e o que foi colocado na véspera.

O peso corporal de cada animal foi medido a cada três dias, a partir do primeiro até o 16<sup>o</sup> dia de prenhez. A partir daí as ratas foram pesadas diariamente até o dia da eutanásia, sendo obtido o peso antes e após a remoção do trato reprodutor e seu conteúdo.

A eutanásia foi realizada por exsanguinação total sob anestesia (90mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilazina, via intraperitoneal) no 21<sup>o</sup> dia de prenhez. No sangue obtido foi feito o hemograma. Os valores para hematimetria, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e índices hematimétricos volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HCM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram determinados em analisador automático de células hematológicas. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa, sendo que em cada extensão foram analisadas e contadas 100 células. As dosagens de colesterol, triglicérides, aspartato transaminase, alanina transaminase, uréia e creatinina foram realizadas imediatamente após a centrifugação do sangue em analisador automático.

Os órgãos maternos (baço, rim, fígado e timo) foram retirados, pesados e fixados em formol Cálcio de Baker para posterior análise histomorfológica.

Removido o sistema reprodutor, os ovários foram removidos, pesados e os corpos lúteos contados com auxílio de microscópio estereoscópico. Em cada corno uterino os implantes foram numerados da extremidade ovárica esquerda até a direita.

#### 5.4.2 Fetais

Cada corno uterino foi seccionado longitudinalmente, os fetos foram retirados de seus envoltórios e foram contadas as reabsorções e identificados os fetos mortos e vivos. Foram considerados vivos os fetos que se moviam espontaneamente ou sob o toque de uma pinça.

Os fetos foram sexados pela observação da distância ano-genital e pesados, assim como suas placentas, agrupados conforme o sexo. Posteriormente foram sacrificados por crioanestesia, medidos individualmente com um paquímetro e examinados para a verificação de malformações externas (fenda palatina, lábio leporino, polidactilia, extrofia cardíaca, celossomia, anoftalmia e outros). Em seguida foram necropsiados, as vísceras abdominais e torácicas examinadas e os seguintes órgãos removidos, pesados e fixados: cérebro, rim, fígado e pulmão (KAVLOK et al., 1982).

#### 5.5 Ipriflavona

A ipriflavona utilizada no experimento foi produzida na China, exportada pela empresa Nanjing Wellchem Enterprise CO., Ltd., importada pela empresa "Deg", lote número 061005 (DCB: 03913.01-5; CAS: 35212-22-7; código: 1,1131-0; fração nº 534068 28/12/06; origem e procedência: China.

#### 5.6 Procedimento estatístico

Os dados obtidos foram analisados através do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Para dados não homocedásticos e sem distribuição normal,

foi usado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. O nível de significância dos testes foi de  $\alpha = 0,05$ .

### 5.7 Comitê de Ética na Experimentação Animal

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora. (Protocolo nº 024/2008).

## 6 RESULTADOS

Na apresentação dos resultados serão sumariados os dados relativos à mãe e posteriormente aqueles referentes aos fetos.

### 6.1 Dados maternos

Em nenhum dos grupos experimentais foram observados indícios clínicos de toxicidade materna como piloereção, hipo ou hipermotilidade no interior da gaiola, estereotípias, diarreia, perdas sanguíneas vaginais e mortes.

A estimativa do consumo médio de ração pelas ratas dos quatro grupos experimentais pode ser observada na FIGURA 4.

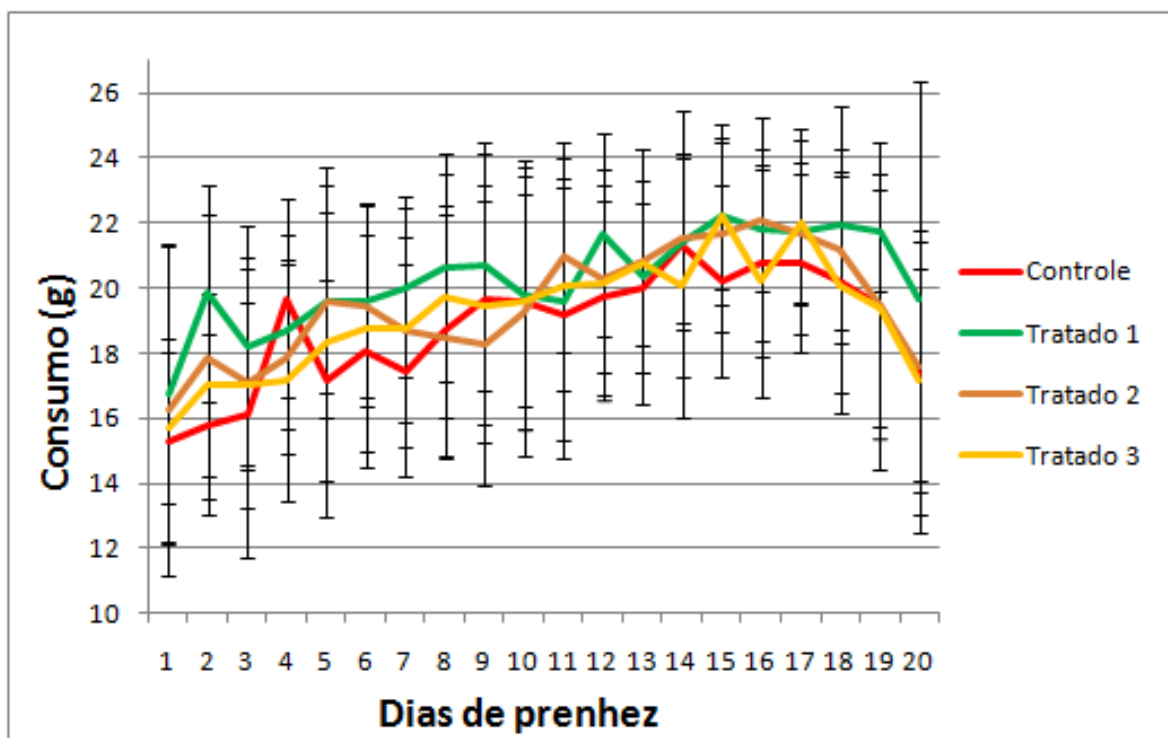


FIGURA 4 – Consumo (g) diário de ração durante a prenhez de ratas dos grupos controle e tratados 1, 2 e 3 (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

Os animais dos grupos tratados 1, 2 e 3 (tratados com 300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona, respectivamente) não apresentaram diferença significativa no consumo de ração em relação ao grupo controle durante a prenhez ( $p > 0.05$ ).

Os pesos corporais maternos dos animais dos quatro grupos experimentais, obtidos ao longo do experimento, encontram-se resumidos na FIGURA 5.

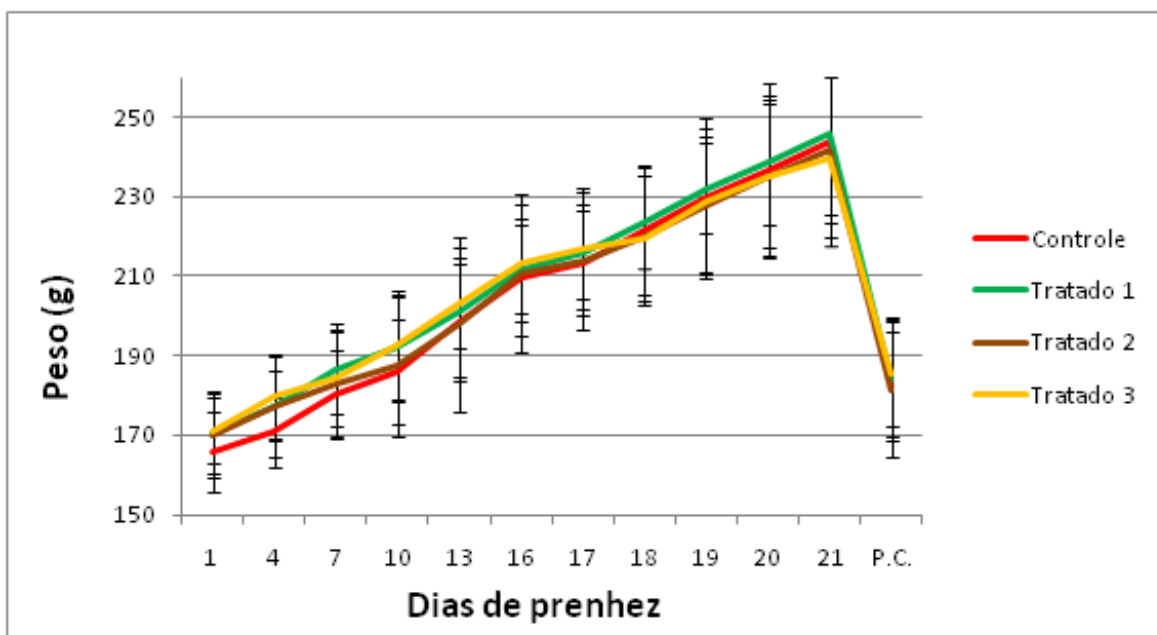


FIGURA 5 – Peso corporal (g) durante a prenhez de ratas dos grupos controle e tratados 1, 2 e 3 (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

P.C. Peso corrigido após a remoção dos cornos uterinos e seu conteúdo.

Durante o experimento, os animais dos grupos tratados (tratados com 300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente) não apresentaram diferença significativa de peso em relação aos animais do grupo controle ( $p>0.05$ ).

Na TABELA 1 encontram-se os pesos dos órgãos de ratas dos grupos controle e tratados.

TABELA 1

Peso do fígado, rins, supra-renal, baço e ovários das ratas dos grupos controle e tratados (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

Controle (n=15)	Tratado 1 (n=15)	Tratado 2 (n=15)	Tratado 3 (n=14)
--------------------	---------------------	---------------------	---------------------

<b>Fígado (g)</b>	8,67 ± 0,89	9,04 ± 1,02	8,86 ± 0,73	8,64 ± 1,02
<b>Ríns (g)</b>	1,29 ± 0,10	1,30 ± 0,10	1,29 ± 0,10	1,31 ± 0,14
<b>Supra-renal (mg)</b>	62 ± 8,39	64,6 ± 9,19	63,47 ± 9,31	59,64 ± 9,12
<b>Baço (mg)</b>	42,33 ± 7,99	43,50 ± 8,98	41,04 ± 6,13	43,53 ± 4,43
<b>Ovários (mg)</b>	70,87 ± 9,64	73,20 ± 9,57	65,80 ± 14,40	67,21 ± 14,04

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (número de casos estudados).

Não foi observada diferença significativa em relação ao grupo controle nos órgãos das ratas tratadas com doses crescentes de ipriflavona (tratados com 300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

Na TABELA 2 podem ser observados os resultados das análises bioquímicas realizadas em animais dos grupos controle e tratados.

TABELA 2

Análise bioquímica do sangue das ratas prenhes dos grupos controle e tratados (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona, via oral, respectivamente).

	<b>Controle</b>	<b>Tratado 1</b>	<b>Tratado 2</b>	<b>Tratado 3</b>
--	-----------------	------------------	------------------	------------------

	(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=14)
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	94,73 ± 14,46	100,33 ± 17,10	91,4 ± 19,66	87,43 ± 17,18
<b>Triglicérides (mg/dl)</b>	138,8 ± 21,89	211,27 ± 63,95*	251,53 ± 65,20*	217,78 ± 49,60*
<b>AST (U/L)</b>	46,73 ± 11,18	51,67 ± 30,78	56 ± 27,30	47,43 ± 16,85
<b>ALT (U/L)</b>	34,87 ± 6,76	39,67 ± 6,71	35,07 ± 7,71	34,86 ± 11,80
<b>Uréia (mg/dl)</b>	44,67 ± 8,76	42,67 ± 8,31	37 ± 11,10	42,64 ± 9,63
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,73 ± 0,14	0,63 ± 0,07	0,67 ± 0,10	0,62 ± 0,12
<b>Glicose (mg/dl)</b>	89,62 ± 14,54	80,93 ± 20,51	77,87 ± 19,91	87 ± 24,27

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (número de casos estudados). \*p<0,05

Nota-se que a concentração plasmática de triglicerídeos foi significativamente maior nos animais tratados com ipriflavona, em comparação com os animais do grupo controle.

A concentração plasmática de colesterol total, uréia, creatinina, glicose, ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) não apresentou diferença significativa nos animais tratados com doses crescentes de ipriflavona em relação aos animais do grupo controle.

Na TABELA 3 são sumariados os resultados dos índices hematológicos em ratas dos grupos controle e tratados.

TABELA 3

Hemograma de ratas controle e tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

	Controle	Tratado 1	Tratado 2	Tratado 3
--	----------	-----------	-----------	-----------



	(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=14)
<b>Hemoglobina (mg/dL)</b>	10,47 ± 0,85	9,96 ± 0,30	9,98 ± 0,81	9,97 ± 1,14
<b>Hematócrito (%)</b>	30,77 ± 2,44	29,35 ± 2,06	28,10 ± 4,30*	27,78 ± 2,55*
<b>Hematimetria (x10<sup>3</sup> (cel/mm<sup>3</sup>))</b>	5592000 ± 528369,5	5092667 ± 454681,5	4989333 ± 589375,8*	5143571 ± 809088,8
<b>Leucócitos (cel/mm<sup>3</sup>)</b>	5686,67 ± 2035,8	4140 ± 1069,58*	3376,67 ± 832,14*	3528,57 ± 1352,02*
<b>Volume Corpuscular médio</b>	10,47 ± 0,85	9,96 ± 0,30	9,98 ± 0,81	9,97 ± 1,14
<b>Hemoglobina Corp. média</b>	50,79 ± 3,98	50,15 ± 3,89	51,13 ± 3,43	50,48 ± 4,59
<b>Conc. de hb Corp. média (%)</b>	18,76 ± 1,74	19,82 ± 1,19	19,67 ± 1,12	19,19 ± 1,71
<b>Bastonetes (%)</b>	1 ± 0	1,6 ± 0,89	1 ± 0	1 ± 0
<b>Segmentados (%)</b>	37,2 ± 6,92	38,43 ± 4,92	39,71 ± 6,14	38,78 ± 7,16
<b>Linfócitos (%)</b>	54,6 ± 8,27	52,78 ± 4,32	51,07 ± 7,88	50,71 ± 7,39
<b>Monócitos (%)</b>	36,5 ± 6,61	38,43 ± 4,92	39,71 ± 6,14	38,78 ± 7,16
<b>Eosinófilos (%)</b>	2,33 ± 1,77	2,82 ± 1,66	2,64 ± 1,50	2,7 ± 1,77

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (número de casos estudados). \*p<0,05

De acordo com a TABELA 3, a contagem de leucócitos nos grupos tratados 1, 2 e 3 diferiu significativamente em relação ao grupo controle. Os índices hematimétricos e a contagem específica de leucócitos das ratas dos grupos tratados com suspensão aquosa de ipriflavona não diferiram significativamente dos animais controles.

Os animais do grupo tratado 2 (1500 mg/kg/dose de ipriflavona) tiveram menos células vermelhas e menor hematócrito, quando comparados aos animais do grupo controle, enquanto que o grupo tratado 3 mostrou, apenas, redução do hematócrito (TABELA 3).

## 6.2 Dados relativos aos fetos

O peso (g) fetal e das placentas das ratas tratadas e controles estão expostos na TABELA 4.

TABELA 4

Peso médio da ninhada e das placentas de ratas controle e tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

	<b>Controle (n=15)</b>	<b>Tratado 1 (n=15)</b>	<b>Tratado 2 (n=15)</b>	<b>Tratado 3 (n=14)</b>
<b>Fetos masculinos</b>	3,39 ± 0,35	3,47 ± 0,25	3,52 ± 0,32	3,41 ± 0,53
<b>Fetos femininos</b>	3,18 ± 0,32	3,17 ± 0,43	3,25 ± 0,30	3,11 ± 0,40
<b>Placentas machos</b>	0,46 ± 0,05	0,45 ± 0,05	0,46 ± 0,04	0,5 ± 0,05
<b>Placentas fêmeas</b>	0,45 ± 0,04	0,43 ± 0,07	0,46 ± 0,06	0,46 ± 0,05

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n= número de casos estudados).  $p > 0.05$

Não foi verificada diferença significativa em relação ao grupo controle em nenhuma das variáveis analisadas na TABELA 4.

O tamanho dos fetos de sexo feminino e o peso de seus fígados, rins, pulmões e cérebros estão expressos na TABELA 5.

TABELA 5

Tamanho (cm) de fetos do sexo feminino e peso (mg) dos órgãos fetais de animais controle e tratados com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona, respectivamente).

	<b>Controle (n=15)</b>	<b>Tratado 1 (n=15)</b>	<b>Tratado 2 (n=15)</b>	<b>Tratado 3 (n=14)</b>
<b>Tamanho</b>	3,94 ± 0,17	3,93 ± 0,22	3,99 ± 0,13	3,94 ± 0,22
<b>Fígado</b>	263,27 ± 37,60	258,67 ± 41,17	274 ± 28,77	255,54 ± 55,90
<b>Ríns</b>	24,33 ± 3,44	24,13 ± 3,96	24,2 ± 3,71	22,08 ± 4,01
<b>Pulmão</b>	104,13 ± 10,15	100,07 ± 14,22	103,53 ± 10,98	97,46 ± 16,45
<b>Cérebro</b>	122,73 ± 12,81	126,6 ± 15,06	123,2 ± 8,90	122,85 ± 20,53

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n= número de casos estudados).  $p > 0.05$

Verifica-se que não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis estudadas.

O tamanho dos fetos de sexo masculino e o peso de seus fígados, rins, pulmões e cérebros estão expressos na TABELA 6.

TABELA 6

Tamanho (cm) de fetos do sexo masculino e peso (mg) dos órgãos fetais de animais controle e tratados com doses crescentes de suspensão aquosa de

ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona, respectivamente).

	<b>Controle (n=15)</b>	<b>Tratado 1 (n=15)</b>	<b>Tratado 2 (n=15)</b>	<b>Tratado 3 (n=14)</b>
<b>Tamanho</b>	4,03 ± 0,17	4,10 ± 0,14	4,14 ± 0,11	4,08 ± 0,14
<b>Fígado</b>	269,6 ± 38,10	272,73 ± 48,25	285 ± 39,07	267,92 ± 48,02
<b>Ríns</b>	26,27 ± 4,04	25,07 ± 5,31	26,4 ± 3,13	23,15 ± 5,93
<b>Pulmão</b>	114,13 ± 15,07	109,53 ± 18,28	115,67 ± 11,70	103,31 ± 10,72
<b>Cérebro</b>	128,57 ± 14,46	129,07 ± 16,19	127,27 ± 12,80	128,46 ± 11,54

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n= número de casos estudados).  $p > 0.05$

Observa-se que não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis estudadas.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA, A.A. 1994. Implantación humana Del pré-embrión: aspectos básicos, clínicos e investigación futura. **Revista Latina Americana Est Fert**, **8**: 4-20.

ALDRIGHI, J.M.; FONSECA, A.M.; ALDRIGHI, A.P.S. 2001. Cautela na prescrição de derivados da soja (ipriflavona) após a menopausa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **47** (4): 272-273.

ALEXANDERSEN, P.; TOUSSAINT, A.; CHRUSTIANSEN, C.; DEVOGELAER, J.P.; ROUX, C. & FECHTENBAUN, J. 2001. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **JAMA**, **285** (11): 1105-1107.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/628\\_01re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/628_01re.htm)>. Acesso em 10 maio 2008.

AZRIA, M.; BEHHAR, C.; COOPER, S. 1993. Lack of effect of ipriflavone on osteoclast motility and bone resorption in vitro and ex vivo studies. **Calcified Tissue International**, **52**: 16-20.

BARNES, S. 1995. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **Nutritional Journal**, **125**: 777-783.

BONEVSKI, B.; WILSON, A.; HENRY, D. A. 2008. An analysis of news media coverage of complementary and alternative medicine. **PLoS ONE**, **3** (6): 2406p.

BONILLA, C.A. 2004. Isoflavonas en ginecología, terapia no convencional. **Revista Colombiana de Obstetricia e Ginecologia**, **55** (3): 209-217.

BONUCCI, E.; BALLANTI, P.; MARTELLI, A.; MERETO, E.; BRAMBILLA, G.; BIANCO, P. & BUFALINO, L. 1992. Ipriflavone inhibits osteoclast differentiation

in parathyroid transplanted parietal bone of rats. **Calcified Tissue International**, **50**: 314-319.

BRASIL. 1995. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6 de 31.1.95. **Diário Oficial da União**, **200 (1)**: 1523-1524.

CAMPBELL, S. 1976. **Fetal Physiology and Medicine**. W.B. Saunders Company Ltd, London, 271-301.

CATALANO, P.J.; SCHARFSTEIN, D.O.; RYAN, L.M.; KIMMEL, C.A. & KIMMEL, G.L. 1993. Statistical model for fetal death, fetal weight, and malformation in development toxicity studies. **Teratology**, **47**: 281-290.

CECCHINI, M.G.; FLEISCH, H.; MUHLBAUER, R.C. 1997. Ipriflavone inhibits bone resorption in intact and ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, **61**: 9-11.

CHAMBÔ FILHO, A.; CHAMBÔ, D.; CHAMBÔ, F. A. 2000. A soja como alimento funcional em ginecologia. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, **15 (2)**: 326-329.

CHAN, W.H.; LU, H.Y. & SHIAO, N.H. 2007. Effect of genistein on mouse blastocyst development in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, **28 (2)**: 238-245.

CHANG, S.K.C. 2002. Isoflavones from soybeans and Soy foods, p. 39-70. In: BY, J.; SHI, G.; MAZZA, M. & MAGUER, L.E. (Ed.). **Functional Foods-Biochemical and Processing Aspects**. Boca Raton: CRC PRESS.

CHRISTIAN, M.S. 2001. Test Methods for assessing female reproductive and development toxicology, p. 1301-1381. In: HAYES, A.W. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis.

CIVITELLI, R. 1997. In vitro and in vivo effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. **Calcified Tissue International**, **61**: S12-S4.

DEWICK, P.M. 1994. In **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**; HARBORNE, J.B., ed.; Chapman and Hall; Great Britain, p. 117-238.

DIEL, P. 2002. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. **Toxicology Letters**, **127** (1-3): 217-224.

DO Y SOUNG; KHALIL, D.A.; ARQUITT, A.B. ; SMITH, B.J. ; HAMMOND, L.J. ; DROKE, E.A. ; LUCAS, E.A. ; DEVAREDDY, L. & ARJMANDI, B.H. 2004. Soy isoflavones prevent the ovarian hormone deficiency-associated rise in leukocytes in rats. **Phytomedicine**, **11** (4): 303 - 308.

DO Y SOUNG; PATADE, A.; KHALIL, D.A.; LUCAS, E.A.; DEVAREDDY, L.; GREAVES, K.A. & ARJMANDI, B.H. 2006. Soy protein supplementation does not cause lymphocytopenia in postmenopausal women. **Nutricional Journal**, **5** (12): 201-205.

DUMM, C.L.A.G. 2006. A primeira semana do desenvolvimento. Segmentação e implantação, p. 46-55. In: DUMM, C.L.A.G. (Ed.). **Embriologia Humana – atlas e texto**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.L.; APPEL, S.; WILKEY, S.; VAN ROMPAY, M. & KESSLER, R.C. 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA**, **280** (18): 1569-1575.

Estrutura química do Estrogênio e Isoflavona, disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br/tema271106.asp>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

Estrutura química da Daidzeína, Genisteína e Gliciteína, disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/cad\\_fotos/283.jpg](http://www.cnpma.embrapa.br/cad_fotos/283.jpg)>. Acesso em: 14 out. 2009.

FERRARI, A.S. & DEMIATE, I.M. 2001. Isoflavonas de soja – uma breve revisão. **Biology Health Science**, 7 (1): 39-46.

FERREIRA, S.H. 1997. **Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências, 131 p.

FRASOR, J.; BARNETT, D.H.; DANES, J.M.; HESS, R.; PARLOW, A.F. & KATZENELLENBOGEN, B.S. 2003. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. **Endocrinology**, 144 (7): 3159-3166.

GARRIDO, A.; DE LA MAZA, M.P.; VALLADARES, L. 2003. Fitoestrógenos dietarios y sus potenciales beneficios en la salud del adulto humano. **Revista Médica de Chile**, 131: 1321-1328.

GUERRA, M.P. & NODARI, R.O. 2004. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos, p. 13-28. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.

HARBONE, J.B. 1988. The flavonoids-advances in research since 1980. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.

HARBONE, J.B. & WILLIAMS, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55: 481-504.

HAVSTEEN, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology Therapy**, 96: 67-202.

HEAD, K.A. 1999. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. **Alternative Medicine Review**, 4 (1): 10-22.



ICH. 2001 Detection of toxicity to reproduction for medicinal products. **Guideline for Industry**. ICH-S5A.

ITO, K.; MINEGISHI, T.; TAKAYAMA, T.; TAMURA, T.; YAMADA, Y.; SATO, S. 2007. Effects of ipriflavone on augmented bone using a guided bone regeneration procedure. **Clinical Oral Implants Research**, **18** (1): 60-68.

IWASAKI, T.; MUKAI, M.; TSUJIMURA, T.; TATSUTA, M.; NAKAMURA, H.; TERADA, N. & AKEDO, H. 2002. Ipriflavone inhibits osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells in a nude mouse model. **International Journal of Cancer**, **100** (4): 381-387.

JOOS, S.; MUSSELMANN, B.; MIKSCH, A.; ROSEMANN, T. & SZECSENYI, J. 2008. The role of complementary and alternative medicine (CAM) in Germany - a focus group study of GPs. **BMC Health Services Research**, **8**: 127.

KATO, H.; MORISHIGE, W.K.; ROTCHILD, I.A. 1979. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteum activity in pregnant rat. **Endocrinology**, **105**: 846-850.

KAVLOCK, R.J.; CHERNOFF, N. & ROGERS, E. 1982. An analysis of fetotoxicity using biochemical endpoints of organ differentiation. **Teratology**, **26**: 183-194.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O. & NOGUEIRA, T.C.M.L. 2004. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, p. 247-262. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.

LEMONICA, I.P. 1996. Embriofetotoxicidade, p.12-94. In: OGA, Seizi. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, Atheneu.

LEVAI, F. & SZATMARI, I. 1995. Pharmacokinetics of ipriflavone. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, **65** (6): 219-222.

MACKEY, R. & EDEN, J. 1998. Phytoestrogens and the menopause. **Climacteric**, 1: 302- 308.

MAKI, K.; NISHIDA, I.; KIMURA, M. 2005. The effect of oral ipriflavone on the rat mandible during growth. **European Journal of Orthodontics**, 27 (1): 27-31.

MANSON, J.M. & KANG, Y. J. 1994. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology.p. 989-1037 In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press.

MATSUOKA, M.; YOSHIDA, Y.; HAYAKAWA, K.; FUKUCHI, S. 1998. Gastrojejunal fistula caused by gastric ulcer **Journal of Gastroenterology**, 33 (2): 267-271.

MOON, Y.; KIM, S.Y.; JI, H.Y.; KIM Y.K.; CHAE, H.J.; CHAE, S.W. & LEE, H.S. 2007. Characterization of cytochrome P450s mediating ipriflavone metabolism in human liver microsomes. **Xenobiotica**, 37 (3): 246-259.

MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. 2004. **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 609p.

MORITO, K.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HIRAKAWA, T.; OKAWA, M.; NOHARA, T.; OGAWA, S.; INOUE, S.; MURAMATSU, M. & MASAMUNE, Y. 2001. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 24 (4): 351-356

NOTOYA, K.; YOSHIDA, K.; TAKETOMI, S.; YAMAZAKI, I. & KUMEGAWA, M. 1993. Inhibitory effect of ipriflavone on osteoclast mediated bone resorption and new osteoclast formation in long-term cultures of mouse infractionated bone cells. **Calcified Tissue International**, 53: 206-209.

PETERSON, G. 1995. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. **Nutrition Journal**, 125: 784-789.

PICHERIT, C.; COXAM, V.; BENNETAU-PELISSERO, C.; KATI-COULIBALY, S.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P. & BARLET, J.P. 2000. Daidzein is more

efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. **The Journal of Nutritional**, 130 (7): 1675-1681.

PINTO, A.S.; OLIVEIRA, T.T.; DEL CARLO, R.J.; NAGEM, T.J.; FONSECA, C.C.; MORAES, G.H.K.; JUNIOR, D.B.F. & CARDOSO, C.A. 2006. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Revista Brasileira Ciência Farmacológica**, 42 (1): 99-107.

PINTO, F.C.M. 2005. Estudo da embriotoxicidade da beta-ionona em ratos. (Dissertação. Mestrado em Saúde Pública). **Escola Nacional de Saúde Pública** – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 81 p.

POWER, K.A. & THOMPSON, L.U. 2003. Ligand-induced regulation of ERalpha and ERbeta is indicative of human breast cancer cell proliferation. **Breast Cancer Research and Treatment**, 81 (3): 209-221.

RICHTER, D.U.; MYLONAS, I.; TOTH, B.; SCHOLZ, C.; BRIESE, V.; FRIESE, K. & JESCHKE, U. 2009. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on progesterone and estrogen (estradiol) production of human term trophoblast cells in vitro. **Gynecological Endocrinology**, 25 (1): 32-38.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K. & TYLER, V.E. 1996. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap. 15, 1102 p.

SCOTT, G.N. & GARY, W.E. 2002. Puesta al día en interacciones entre productos naturales y medicamentos. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 59 (4): 339-347.

SETCHELL, K.D. 1998. Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, 134 (6): 1333-1343.

SONG, T.T.; HENDRICH, S. & MURPHY, P.A. 1999. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 1607-1610.

TANI, S.; MATSUDA, K. & TANAKA, T. 2004. Induction of Apoptosis in Cultured Rat Gastric Epithelial Cells by Ipriflavone: Comparison with Indomethacin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **27** (5): 647-651.

TESCH, B.J. 2003. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, **188** (5): 44-55.

TOVAR, G.R. & ACOSTA, R.A. 2004. Amenorrea secundaria a ingestión de lecitina de soya. **Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología**, **30** (1).

TRUEBA, G.P. & SANCHEZ, G.M. 2001. Los Flavonoides como antioxidantes naturales. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap.23, 1102p.

TSUTSUMI, N.; KAWASHIMA, K.; NAGATA, H.; TSUYUKI, J.; ITOH, F.; ARAI, N.; KOJIMA, M.; UJIIE, A. & ENDO, H. 1994. Effects of KCA-098 on bone metabolism: comparison with those of ipriflavone. **Japanese Journal of Pharmacology**, **65** (4): 343-349.

USDC, 1999 – Department of Commerce. <http://strategis.ic.gc.ca/SSG/DD73073.html>. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.

WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q.; BARNES, S. & WANG, Y. 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **208** (1): 124-130.

WOLFENSOHN, S. & LLOYD, M. 1998. **Handbook of laboratory animal manangement and welfare**. Blackwell Science Ltda 334p.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P. & MEYEROWITZ, E. 1998. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. Porto Alegre: Artmed, 484p.

WU, Z.; YANG, Y.; CHEN, Y.; XIA, G. & ZHANG, R. 2005. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. **Food and Chemical Toxicology**, **43** (1): 167-172.

YAMAZAKI, I. 1985. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. **Life Science**, **38** (8): 757-764.

YOSHIDA, K.; TSUKAMOTO, T.; TORII, H.; DOI, T.; NAESHIRO, I.; SHIBATA, K.; UEMURA, I. & TANAYAMA, S. 1985. Disposition of ipriflavone (TC-80) in rats and dogs. **Radioisotopes**, **34** (11): 618-623.

ZAVA, D. T. & DUWE, G. 1997. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer in vitro. **Nutrition and Cancer**, **27** (1): 31-40.

ZHANG, Y.; SONG, T.T.; CUNNING, J.E.; MURPHY, P.A. & HENDRICH, S. 1999. Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentration. **Journal of Nutrition**, **129**: 399-405.

ZHANG, X.; LI, S.W.; WU, J.F.; DONG, C.L.; ZHENG, C.X.; ZHANG, Y.P. & DU, J. 2009. Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis. **Gynecological Endocrinology**, **11**: 1-5.

ZUANAZZI, J.A.S. & MONTANHA, J.A. 2004. Flavonoides, 578-614. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.

**APÊNDICE A** - Resumos apresentados no Congresso Brasileiro de  
Toxicologia 2009

*Análises bioquímicas em ratas wistar prenhes tratadas com  
suspensão aquosa de ipriflavona*

BELLEI, P.M.<sup>1</sup>; SANTOS, T.R.<sup>2</sup>; TERRA, M.M.<sup>2</sup>; MARQUES\*, R.M.<sup>2</sup>; GUERRA,  
M.O.<sup>3</sup>; PETERS, V.M.<sup>3</sup>

1- Mestrando em Ciências Biológicas – Biologia e Comportamento Animal /  
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) 2- Bolsistas de Iniciação  
Científica do Centro de Biologia da Reprodução / UFJF 3- Pesquisadoras do  
Centro de Biologia da Reprodução / UFJF.

**Introdução:** A ipriflavona é um flavonóide sintético, derivado da soja, que possui estrutura química semelhante ao estradiol, sendo amplamente utilizado na prevenção da osteoporose. É metabolizada por oxidação no fígado e sua excreção é feita, principalmente, pela via urinária. Não foram encontrados estudos sobre a ação da ipriflavona nas variáveis bioquímicas do sangue de animais, mas em mulheres é demonstrado que uma alimentação rica em soja causa diminuição do colesterol total, do LDL-col e dos triglicerídeos. **Objetivo:** Verificar o efeito da administração da suspensão aquosa de ipriflavona a ratas prenhes, durante o período de fetogênese, sobre a bioquímica hepática, renal, concentração de colesterol, triglicérides e glicose. **Metodologia:** Ratas no 1<sup>o</sup> dia pós-coito (pc) provenientes do Biotério do CBR/UFJF e mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e ventilação, foram distribuídas, aleatoriamente, em um grupo controle - C (1ml de água destilada) e três tratados T1, T2 e T3 que receberam, respectivamente, 300 ; 1500 e 3000mg/kg de ipriflavona, via intragástrica, nos dias 16 a 20 pc. Os animais foram eutanaziados no 21<sup>o</sup> dia pc por exsanguinação total sob anestesia (Xilazina + Ketamina). No sangue foram medidos: colesterol, triglicérides, transaminases hepáticas (AST e ALT), uréia, creatinina e glicose. Estatística: ANOVA seguida de teste de Dunnet ( $\alpha = 0.05$ ), se não houvesse violação dos princípios de homocedasticidade e distribuição normal, caso contrário foi usado teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. O procedimento experimental foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da

Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº 024/2008) **Resultado:** Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração plasmática de triglicérides no grupo T1 ( $211,27 \pm 63,95$ ), T2 ( $251,53 \pm 65,20$ ) e T3 ( $217,78 \pm 49,60$ ) em relação ao Controle ( $217,78 \pm 49,60$ ). **Conclusão:** Apesar de estudos mostrarem que a alimentação rica em soja acarreta uma diminuição do colesterol total, do LDL-col e dos triglicérides, em ratas prenhes, do presente estudo, a ipriflavona causou aumento na concentração de triglicérides. **Financiamento:** Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos 173/08 e Rede Mineira de Bioterismo 172/08 - FAPEMIG

*Perfil hematológico de ratas wistar prenhes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona*

BELLEI, P.M.<sup>1</sup>; SANTOS, T.R.<sup>2</sup>; TERRA, M.M.<sup>2</sup>; PONTE\*, T.F.<sup>2</sup>; GUERRA, M.O.<sup>3</sup>; PETERS, V.M.<sup>3</sup>.

1- Mestrando em Ciências Biológicas – Biologia e Comportamento Animal / Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) 2- Bolsistas de Iniciação Científica do Centro de Biologia da Reprodução / UFJF. 3- Pesquisadoras do Centro de Biologia da Reprodução / UFJF.

**Introdução:** A ipriflavona, um flavonóide sintético derivado da soja, possui estrutura química semelhante ao estradiol e sua ação terapêutica principal é a prevenção e tratamento da osteoporose. Seu metabolismo ocorre por oxidação no fígado e a excreção principalmente pela via urinária, biliar e fecal. Foi verificado que a ipriflavona induziu linfocitopenia em significativo número de mulheres. Em outro estudo, porém, é sugerido que ingestão moderada de ipriflavona e outras isoflavonas da soja, não só causariam linfocitopenia, como também corrigiriam a leucocitose resultada de deficiências hormonais ovarianas. **Objetivo:** O presente trabalho procurou verificar o efeito da administração da suspensão aquosa de ipriflavona, administrada a ratas prenhes no período de fetogênese, sobre os componentes sanguíneos. **Metodologia:** Ratas no 1<sup>o</sup> dia pós-coito (pc) provenientes do Biotério do CBR/UFJF e mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e ventilação, foram distribuídas, aleatoriamente, em um grupo controle - C (1ml de água destilada) e três tratados T1, T2 e T3 que receberam, respectivamente, 300 ; 1500 e 3000mg/kg de ipriflavona, via intragástrica, nos dias 16 a 20 pc. Os animais foram eutanaziadas no 21<sup>o</sup> dia pc por exsanguinação total sob anestesia (Xilazina + Ketamina). Variáveis: Hemograma completo. Estatística: ANOVA seguida de teste de Dunnet ( $\alpha = 0.05$ ), se não houvesse violação dos princípios de homocedasticidade e distribuição normal, caso contrário foi usado teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº 024/2008) **Resultado:**



Os animais do grupo T2 tiveram menos células vermelhas ( $4989333 \pm 589375,8$ ) em comparação com os controles ( $5592000 \pm 528369,5$ ). O Hematócrito das ratas, dos grupos T2 ( $28,1 \pm 4,30$ ) e T3 ( $27,78 \pm 2,55$ ), foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que o dos animais do grupo controle ( $30,77 \pm 2,44$ ). **Conclusão:** No modelo experimental utilizado, a solução aquosa de ipriflavona parece diminuir o hematócrito dos animais tratados com as maiores doses de ipriflavona (1500 e 3000mg/Kg). **Financiamento:** Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos 173/08 e Rede Mineira de Bioterismo 172/08 - FAPEMIG

*Desenvolvimento fetal em ratas expostas a ipriflavona*

BELLEI, P.M.<sup>1</sup>; SANTOS, T.R.<sup>2</sup>; TERRA, M.M.<sup>2</sup>; MARQUES, R.M.<sup>2</sup>; PONTE\*, T.F.<sup>2</sup>; GUERRA, M.O.<sup>3</sup>; PETERS, V.M.<sup>3</sup>

1-Mestrando em Ciências Biológicas – Biologia e Comportamento Animal / Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) 2-Bolsistas Iniciação Científica do Centro de Biologia da Reprodução/UFJF 3-Pesquisadoras do Centro de Biologia da Reprodução / UFJF.

**Introdução:** No período de fetogênese, completa-se a formação do sistema nervoso e de genitais externos e ocorre crescimento fetal, que podem ser lesados pela exposição a agentes tóxicos. Fitoterápicos e fitofármacos muitas vezes são utilizados sem os cuidados necessários por serem produtos naturais, considerados inofensivos. A ipriflavona, um flavonóide sintético derivado da soja, possui estrutura química semelhante ao estradiol, efetiva na prevenção e tratamento da osteoporose. Por apresentar atividade estrogênica e inibir a proliferação e síntese de DNA em células ósseas, a ipriflavona pode interferir no crescimento e desenvolvimento fetal. Objetivo: O presente trabalho buscou verificar o efeito da suspensão aquosa de ipriflavona no desenvolvimento de fetos de ratas Wistar expostas ao produto no período da fetogênese.

**Metodologia:** Ratas no 1<sup>o</sup> dia pós-coito (pc) provenientes do Biotério do CBR/UFJF e mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e ventilação, foram distribuídas, aleatoriamente, em um grupo controle - C (1ml de água destilada) e três tratados T1, T2 e T3 que receberam, respectivamente, 300 ; 1500 e 3000mg/kg de ipriflavona, via intragástrica, nos dias 16 a 20 pc. Os animais foram eutanaziados no 21<sup>o</sup> dia pc por exsanguinação total sob anestesia (Xilazina + Ketamina). Variáveis analisadas: comprimento fetal e peso corporal e de placentas. Peso de cérebro, fígado, rins e pulmão fetais. Estatística: ANOVA seguida de teste de Dunnet ( $\alpha = 0.05$ ), se não houvesse violação dos princípios de homocedasticidade e distribuição normal, caso contrário foi usado teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. O procedimento experimental foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº

024/2008). **Resultado:** Não foi verificada diferença significativa em nenhuma das variáveis estudadas. **Conclusão:** No modelo experimental utilizado, a ipriflavona não causou alterações significativas no desenvolvimento fetal. **Financiamento:** Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos 173/08 e Rede Mineira de Bioterismo 172/08 – FAPEMIG.

## APÊNDICE B - ARTIGO DESENVOLVIDO

### DESENVOLVIMENTO FETAL EM RATAS WISTAR TRATADAS COM IPRIFLAVONA DURANTE A FETOGÊNESE

Pedro Martins Bellei, Martha de Oliveira Guerra, Vera Maria Peters  
Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora,  
Caixa Postal 328, CEP 36001-970 Juiz de Fora, MG, Brasil

#### INTRODUÇÃO:

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona) é uma isoflavona sintética derivada da daidzeína, encontrada em grãos de soja e derivados, sendo comercializada com a finalidade de prevenir e/ou tratar a osteoporose (GARRIDO et al., 2003; BONILLA, 2004; PINTO et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

Foi verificado *in vitro* que a ipriflavona (IP) induziu a apoptose em células epiteliais gástricas (TANI et al., 2004), e inibiu a proliferação e síntese de DNA de células tumorais ósseas (IWASAKI et al., 2002). Em estudos prévios, ainda não publicados, realizado por Fernandes e col. (2008), foi observado que a ipriflavona exerceu efeito antiimplantação em blastocistos de ratas Wistar.

Estudos com a daidzeína, precursora da Ipriflavona, mostram efeito antiimplantação em ratas (WU et al., 2005) e redução da produção de progesterona em células trofoblásticas humanas (RICHTER et al., 2009). Também se sabe que a genisteína, estruturalmente semelhante a ipriflavona, exerce efeitos lesivos no blastocisto de camundongos, cultivados *in vitro* (induz a apoptose, diminui o número de células, retarda o desenvolvimento pós-implantação e aumenta incidência de morte precoce de blastocistos) e *in vivo*

(induz apoptose e inibe a proliferação celular do blastocisto) (CHAN et al., 2007).

Sendo a fetogênese um período do desenvolvimento embrionário caracterizado por intensa mitose e proliferação celular; e onde a apoptose é extremamente importante para o remodelamento na formação de órgãos e tecidos de sistemas fetais (WOLPERT, 1998; MOORE e PERSAUD 2004; PAUMGARTTEN, 2009), a IP poderia interferir no desenvolvimento fetal, causando retardo de crescimento intra-uterino, uma das alterações observadas em fetos cujas mães foram expostas a xenobióticos no período de fetogênese (MANSON et al., 1994; CHRISTIAN, 2001; ERGAZ et al., 2005).

Dada a grande utilização da IP na prevenção de osteoporose (PINTO et al., 2006; ZHANG et al., 2009); a escassez de informações a respeito do seu efeito na reprodução; o efeito apoptótico (TANI et al., 2004) e inibidor da síntese de DNA (IWASAKI et al., 2002); e considerando que a daidzeína, precursora da IP diminui a produção de progesterona (RICHTER et al., 2009) fica evidente a necessidade de estudar o efeito da IP no desenvolvimento fetal, que foi o objetivo do presente estudo no qual ratas foram tratadas com solução aquosa de Ipriflavona durante o período de fetogênese.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

### *Ipriflavona:*

A ipriflavona utilizada no experimento foi produzida na China, exportada pela empresa Nanjing Wellchem Enterprise CO., Ltd., importada pela empresa “Deg”, lote número 061005 (DCB: 03913.01-5; CAS: 35212-22-7; código: 1,1131-0; fração nº 534068 28/12/06; origem e procedência: China

### *Animais:*

Foram usadas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) com  $180 \pm 15$  g de peso, nulíparas e nuligestas, com três meses de idade, obtidas na colônia do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) – Universidade Federal de Juiz de Fora. Durante o experimento os animais foram alojados individualmente em microisoladores Alesco®, com temperatura de 22°,

umidade relativa de 50-60% e 12h de ciclo claro/escuro. Os animais recebiam 25g de ração comercial Nuvilab® por dia e água *ad libitum*.

#### *Desenho experimental:*

Os animais foram acasalados no sistema poligâmico, com machos de fertilidade previamente comprovada, ao final da tarde (17:00h), na proporção de 3 fêmeas:1 macho. Na manhã seguinte, identificaram-se os animais inseminados pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, sendo este dia designado o dia 1 pós-coito (p.c.) (KATO et al., 1979).

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, cada grupo contendo 15 animais: Tratados I, II e III e Controle. Os grupos Tratados I, II e III receberam, respectivamente, via intragástrica, duas vezes ao dia (7 e 19h), 1mL de suspensão aquosa de ipriflavona, nas doses de 300, 1500 e 3000mg/kg/dose (dose terapêutica, 5 vezes e 10 vezes a dose indicada para uso humano). As ratas do grupo Controle receberam, pela mesma via, 1mL de água destilada. Este procedimento foi realizado do 16<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dia de prenhez, via intragástrica, por gavagem, às 6:00h e 18:00h.

#### *Variáveis maternas:*

As ratas prenhes foram observadas diariamente para a avaliação de sinais clínicos de toxicidade materna (piloereção, hipo ou hipermotilidade no interior da gaiola, estereotípias, cromodacriorreia, diarreia, perdas sanguíneas vaginais e mortes) (CHRISTIAN, 2001).

O consumo materno de ração também foi registrado durante toda a gestação. Para isso foram oferecidos a cada animal, diariamente, sempre no mesmo horário, 25g de ração. No dia seguinte estimou-se o consumo através da diferença de peso entre a sobra da ração encontrada em cada gaiola e o que foi colocado na véspera.

O peso corporal de cada animal foi medido a cada três dias, a partir do primeiro até o 16<sup>o</sup> dia de prenhez. A partir daí as ratas foram pesadas diariamente até o dia da eutanásia, sendo obtido o peso antes e após a remoção do trato reprodutor e seu conteúdo.

A eutanásia foi realizada por exsanguinação total sob anestesia (90mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilazina, via intraperitoneal) no 21<sup>o</sup> dia de

prenhez. No sangue obtido foi feito o hemograma. Os valores para hematimetria, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e índices hematimétricos volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HCM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram determinados em analisador automático de células hematológicas. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa, sendo que em cada extensão foram analisadas e contadas 100 células. As dosagens de colesterol, triglicérides, aspartato transaminase, alanina transaminase, uréia e creatinina foram realizadas imediatamente após a centrifugação do sangue em analisador automático.

Os órgãos maternos (baço, rim, fígado e timo) foram retirados, pesados e fixados em formol Cálcio de Baker para posterior análise histomorfológica.

Removido o sistema reprodutor, os ovários foram removidos, pesados e os corpos lúteos contados com auxílio de microscópio estereoscópico. Em cada corno uterino os implantes foram numerados da extremidade ovárica esquerda até a direita.

Cada corno uterino foi seccionado longitudinalmente, os fetos foram retirados de seus envoltórios e foram contadas as reabsorções e identificados os fetos mortos e vivos. Foram considerados vivos os fetos que se moviam espontaneamente ou sob o toque de uma pinça.

Os fetos foram sexados pela observação da distância ano-genital e pesados, assim como suas placentas, agrupados conforme o sexo. Posteriormente foram sacrificados por crioanestesia, medidos individualmente com um paquímetro e examinados para a verificação de malformações externas (fenda palatina, lábio leporino, polidactilia, extrofia cardíaca, celossomia, anoftalmia e outros). Em seguida foram necropsiados, as vísceras abdominais e torácicas examinadas e os seguintes órgãos removidos, pesados e fixados: cérebro, rim, fígado e pulmão (KAVLOK et al., 1982).

#### *Análise estatística:*

Todos os dados foram analisados com o auxílio do software “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) 13.0. Os dados obtidos foram analisados através do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Para dados

não homocedásticos e sem distribuição normal, foi usado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. O nível de significância dos testes foi de  $\alpha = 0,05$

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora sob protocolo nº 024/2008.

## **RESULTADOS:**

Nenhuma rata apresentou sinais clínicos de toxicidade materna e não foi verificada nenhuma morte. O GRÁFICO 1 mostra a média do consumo de ração durante a gestação, não evidenciando diferença significativa entre os grupos. Também não foi verificada diferença significativa de ganho de peso corporal entre o grupo controle e os grupos tratados com IP durante o experimento (GRÁFICO 2).

Não foram verificadas diferenças significativas entre os pesos de fígado, rins, supra-renal e ovários das ratas tratadas com IP (TABELA 1) ou diferenças significativas em relação à proporção de reabsorções, número de corpos lúteos, de implantes e de fetos vivos (TABELA 2).

Na tabela 3, onde são expressos os dados referentes às análises bioquímicas, pode-se observar aumento na concentração plasmática de triglicérides das ratas tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona. Com relação ao hemograma (TABELA 4), a contagem de leucócitos nos grupos tratados 1, 2 e 3 diferiu significativamente em relação ao grupo controle. Os animais do grupo tratado 2 (1500 mg/kg/dose de ipriflavona) tiveram menos células vermelhas e menor hematócrito, quando comparados aos animais do grupo controle, enquanto que o grupo tratado 3 mostrou, apenas, redução do hematócrito.

A TABELA 5 mostra as variáveis fetais analisadas. O peso das ninhadas e das placentas foram semelhantes em todos os grupos. Os tamanhos, pesos corporais e dos órgãos dos fetos do sexo feminino e masculino não diferiram significativamente entre os grupos. Não foram observadas malformações externas em nenhum dos fetos examinados.



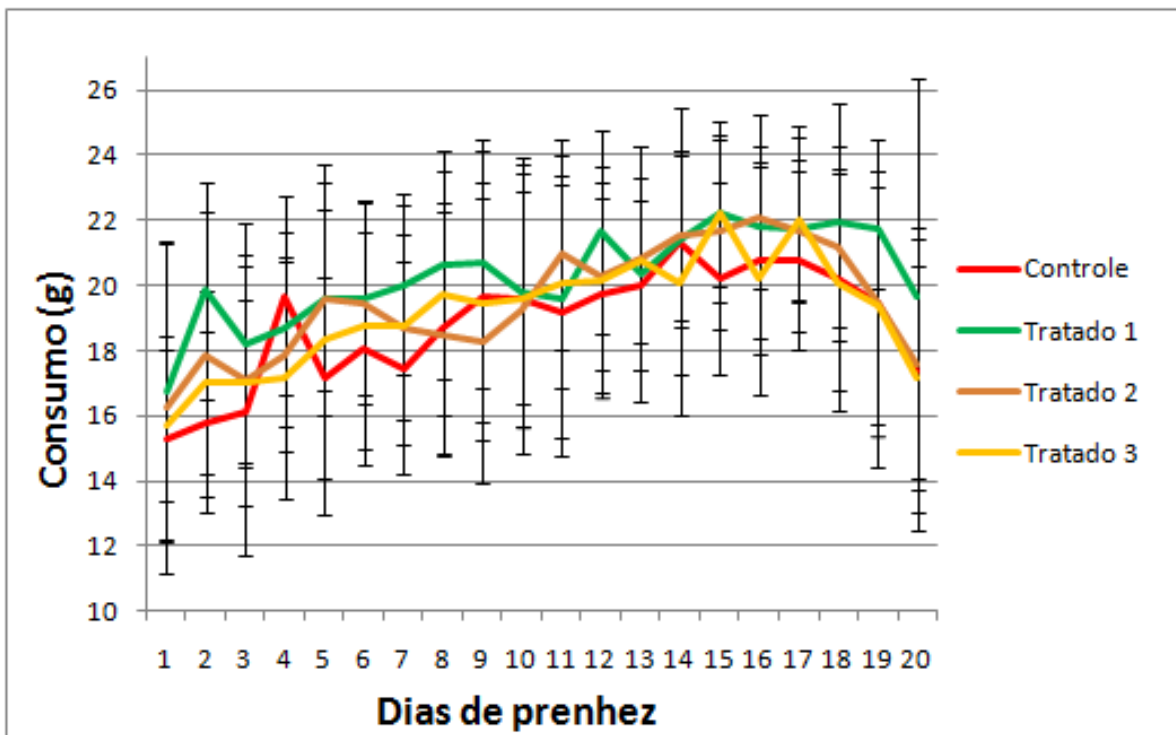


GRÁFICO 1 – Consumo (g) diário de ração durante a prenhez de ratas dos grupos controle e tratados 1, 2 e 3 (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

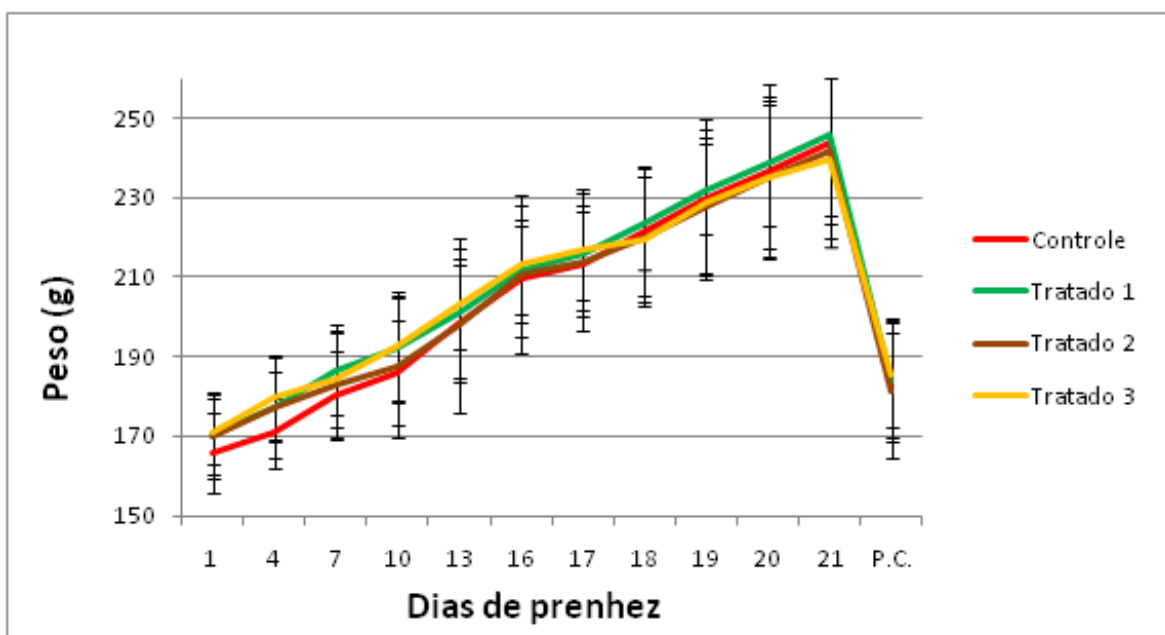


GRÁFICO 2 – Peso corporal (g) durante a prenhez de ratas dos grupos controle e tratados 1, 2 e 3 (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

P.C. Peso corrigido após a remoção dos cornos uterinos e seu conteúdo.

TABELA 1

Peso do fígado, rins, supra-renal, baço e ovários das ratas dos grupos controle e tratados (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente) do 16<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dia de prenhez.

	Controle (n=15)	Tratado 1 (n=15)	Tratado 2 (n=15)	Tratado 3 (n=14)
Fígado (g)	8,67 ± 0,89	9,04 ± 1,02	8,86 ± 0,73	8,64 ± 1,02
Ríns (g)	1,29 ± 0,10	1,30 ± 0,10	1,29 ± 0,10	1,31 ± 0,14
Supra-renal (mg)	62 ± 8,39	64,6 ± 9,19	63,47 ± 9,31	59,64 ± 9,12
Baço (mg)	42,33 ± 7,99	43,50 ± 8,98	41,04 ± 6,13	43,53 ± 4,43
Ovários (mg)	70,87 ± 9,64	73,20 ± 9,57	65,80 ± 14,40	67,21 ± 14,04

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (número de casos estudados).  $p > 0,05$

TABELA 2

Proporção de reabsorções, número de corpos lúteos, implantes e fetos vivos das ratas dos grupos controle e tratados (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona, via oral, respectivamente).

	Controle (n=15)	Tratado 1 (n=15)	Tratado 2 (n=15)	Tratado 3 (n=14)
Proporção de reabsorções (%)*	4,4 (7/159)	3,2 (5/156)	6 (9/149)	5,4 (7/130)
Corpos lúteos	12,3 ± 1,4	12 ± 1,36	11,13 ± 1,96	11,28 ± 1,32
Implantes	11,4 ± 2,29	10,4 ± 1,76	9,93 ± 1,62	9,28 ± 2,95
Fetos vivos	10,33 ± 3,31	10,00 ± 1,65	9,33 ± 1,88	8,71 ± 2,87

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (número de casos estudados).  $p > 0,05$

\* % / grupo

( ) Reabsorções/implantes x 100

TABELA 3

Análise bioquímica do sangue das ratas prenhes dos grupos controle e tratados (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona, via oral, respectivamente).

	Controle (n=15)	Tratado 1 (n=15)	Tratado 2 (n=15)	Tratado 3 (n=14)
Colesterol (mg/dl)	94,73 ± 14,46	100,33 ± 17,10	91,4 ± 19,66	87,43 ± 17,18
Triglicérides (mg/dl)	138,8 ± 21,89	211,27 ± 63,95*	251,53 ± 65,20*	217,78 ± 49,60*
AST (U/L)	46,73 ± 11,18	51,67 ± 30,78	56 ± 27,30	47,43 ± 16,85
ALT (U/L)	34,87 ± 6,76	39,67 ± 6,71	35,07 ± 7,71	34,86 ± 11,80
Uréia (mg/dl)	44,67 ± 8,76	42,67 ± 8,31	37 ± 11,10	42,64 ± 9,63
Creatinina (mg/dl)	0,73 ± 0,14	0,63 ± 0,07	0,67 ± 0,10	0,62 ± 0,12
Glicose (mg/dl)	89,62 ± 14,54	80,93 ± 20,51	77,87 ± 19,91	87 ± 24,27

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (número de casos estudados). \*p<0,05

TABELA 4

Hemograma de ratas controle e tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona respectivamente).

	Controle (n=15)	Tratado 1 (n=15)	Tratado 2 (n=15)	Tratado 3 (n=14)
Hemoglobina (mg/dL)	10,47 ± 0,85	9,96 ± 0,30	9,98 ± 0,81	9,97 ± 1,14
Hematócrito (%)	30,77 ± 2,44	29,35 ± 2,06	28,10 ± 4,30*	27,78 ± 2,55*
Hematimetria (x10 <sup>3</sup> (cel/mm <sup>3</sup> ))	5592000 ± 528369,5	5092667 ± 454681,5	4989333 ± 589375,8*	5143571 ± 809088,8
Leucócitos (cel/mm <sup>3</sup> )	5686,67 ± 2035,8	4140 ± 1069,58*	3376,67 ± 832,14*	3528,57 ± 1352,02*
Volume Corpuscular médio	10,47 ± 0,85	9,96 ± 0,30	9,98 ± 0,81	9,97 ± 1,14
Hemoglobina Corp. média	50,79 ± 3,98	50,15 ± 3,89	51,13 ± 3,43	50,48 ± 4,59
Conc. de hb Corp. média (%)	18,76 ± 1,74	19,82 ± 1,19	19,67 ± 1,12	19,19 ± 1,71
Bastonetes (%)	1 ± 0	1,6 ± 0,89	1 ± 0	1 ± 0
Segmentados (%)	37,2 ± 6,92	38,43 ± 4,92	39,71 ± 6,14	38,78 ± 7,16
Linfócitos (%)	54,6 ± 8,27	52,78 ± 4,32	51,07 ± 7,88	50,71 ± 7,39
Monócitos (%)	36,5 ± 6,61	38,43 ± 4,92	39,71 ± 6,14	38,78 ± 7,16
Eosinófilos (%)	2,33 ± 1,77	2,82 ± 1,66	2,64 ± 1,50	2,7 ± 1,77

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (número de casos estudados). \*p<0,05

TABELA 5

Peso médio de fetos (g), placentas (g), tamanho (cm) e peso de órgãos fetais divididos por sexo obtidos de ratas controle e tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona (300, 1500 e 3000mg/kg/dose, respectivamente)

Variáveis	Controle (n=15)		Tratado 1 (n=15)		Tratado 2 (n=15)		Tratado 3 (n=14)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Fetos	3,39 ± 0,35	3,18 ± 0,32	3,47 ± 0,25	3,17 ± 0,43	3,52 ± 0,32	3,25 ± 0,30	3,41 ± 0,53	3,11 ± 0,40
Placentas	0,46 ± 0,05	0,45 ± 0,04	0,45 ± 0,05	0,43 ± 0,07	0,46 ± 0,04	0,46 ± 0,06	0,5 ± 0,05	0,46 ± 0,05
Tamanho	4,03 ± 0,17	3,94 ± 0,17	4,10 ± 0,14	3,93 ± 0,22	4,14 ± 0,11	3,99 ± 0,13	4,08 ± 0,14	3,94 ± 0,22
Fígado	269,6 ± 38,10	263,27 ± 37,60	272,73 ± 48,25	258,67 ± 41,17	285 ± 39,07	274 ± 28,77	267,92 ± 48,02	255,54 ± 55,90
Ríns	26,27 ± 4,04	24,33 ± 3,44	25,07 ± 5,31	24,13 ± 3,96	26,4 ± 3,13	24,2 ± 3,71	23,15 ± 5,93	22,08 ± 4,01
Pulmão	114,13 ± 15,07	104,13 ± 10,15	109,53 ± 18,28	100,07 ± 14,22	115,67 ± 11,70	103,53 ± 10,98	103,31 ± 10,72	97,46 ± 16,45
Cérebro	128,57 ± 14,46	122,73 ± 12,81	129,07 ± 16,19	126,6 ± 15,06	127,27 ± 12,80	123,2 ± 8,90	128,46 ± 11,54	122,85 ± 20,53

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n= número de casos estudados).  $p > 0.05$

## DISCUSSÃO:

Toxicidade materna é definida como alterações temporárias ou permanentes na fisiologia materna – que podem alterar o desenvolvimento embriofetal e pós-natal (KHERA 1985). A toxicidade materna pode ser observada por diferentes alterações clínicas, como diminuição de peso corporal, alterações locomotoras, diarreia, piloereção e redução do consumo de água e alimento e mortes (KHERA 1984; KHERA 1987; PINTO et al., 2007). No presente estudo não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna, sugerindo que a IP não foi tóxica para as ratas, entretanto, foram encontradas alterações hematológicas e bioquímicas.

Segundo estudos anteriores, realizados em mulheres não grávidas, uma dieta rica em isoflavonas diminui a concentração plasmática de colesterol total e triglicérides (VINCENT e FITZPATRICK, 2000; CEDERROTH e NEF, 2009), dados que discordam do que se observou com a IP no presente trabalho. Os dados em humanos referem-se a isoflavonas, generalizadamente, enquanto que nesse ensaio foi utilizada somente a IP. Sosić-Jurjević et al. (2007) demonstraram em ratos, que a daidzeína, precursora da IP, aumentou o nível sérico de triglicérides. Dessa forma, é possível sugerir que a IP aumente a concentração de triglicérides em ratas prenhes, sendo esse o primeiro relatado na literatura sobre o efeito da IP durante a gestação.

Não foram encontrados dados na literatura que permitissem explicar a leucopenia em animais tratados com IP, e considerando que a contagem específica de leucócitos não apresentou alteração significativa é possível que se deva à grande variabilidade na contagem dos leucócitos, já apresentada por outros autores, sem significado patológico (LABORDE et al., 1999).

Hematócrito e hematimetria reduziram-se nos animais que receberam a dose intermediária (1500 mg/kg/) de ipriflavona, quando comparados aos animais do grupo controle, enquanto que o grupo que recebeu a maior dose mostrou redução do hematócrito, entretanto os valores de hemoglobina, CHGM e HGM não diferiram em relação ao controle, tornando-se difícil explicar as razões para tais dados.

Na fetogênese, ocorre basicamente o rápido crescimento do corpo e a diferenciação de órgãos, tecidos e sistemas, resultando num ganho de peso e crescimento corporal muito grande (MOORE e PERSAUD, 2004; PAUMGARTTEN, 2009). Sendo característicos deste período a histogênese,

maturação funcional e crescimento. Por ser um processo determinado por uma complexa relação de fatores (genéticos, imunológicos, endócrinos, nutricionais e vasculares), qualquer alteração em algum destes processos poderia levar a uma alteração no desenvolvimento fetal (CAMPBELL, 1976).

A morte celular seletiva, conhecida como apoptose, é um mecanismo, controlado geneticamente que está envolvido na morfogênese de sistemas, órgãos e tecidos na fetogênese (WOLPERT, 1998; MOORE e PERSAUD 2004; JESEK e KOZINA, 2009). Na formação dos membros nos vertebrados, a apoptose é essencial para a separação dos dígitos. Assim como na formação do sistema nervoso, onde a apoptose causa uma extensa morte de neurônios (WOLPERT, 1998). A IP, através da indução de apoptose (TANI et al., 2004), poderia potencializar aquele efeito, causando redução da massa encefálica, o que não foi observado no presente trabalho. Entretanto, o trabalho não acompanhou o desenvolvimento pós-natal, não sendo possível garantir que não tenha havido algum problema com o desenvolvimento neural.

Foi observado que a daidzeína administrada de forma subcutânea, apresentou efeito antiimplantação em blastocistos de ratas, diminuindo o nível sérico de GnRH, progesterona e dos hormônios gonadotrópicos (FSH e LH), interferindo no eixo hipotálamo hipofisário (WU et al., 2005). Também foi visto que a genisteína e a daidzeína reduzem a produção de progesterona nas células trofoblásticas humanas, provavelmente devido ao bloqueio dos receptores de estrógeno causado pelos fitoestrógenos (RICHTER et al., 2009).

Pelo fato da ipriflavona ser um derivado sintético estruturalmente parecida com a daidzeína (ZHANG et al., 2009), e esta afetar a produção de progesterona, a ipriflavona poderia ser prejudicial ao desenvolvimento fetal. Porém, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a ipriflavona, nas doses utilizadas, não alterou o desenvolvimento físico fetal.

Entre os fatores que podem alterar o crescimento e desenvolvimento fetal, os fatores genéticos podem ser responsáveis pelo chamado “Retardo de Crescimento Intra Uterino” (RCIU). O RCIU é causado por alterações nos processos de divisão celular que levam ao crescimento corporal e diferenciação de órgãos, tecidos e sistemas (ERGAZ et al., 2005; BURDAN, 2003), ocasionando o desenvolvimento de órgãos hipotrofiados,

hipofuncionais e deficiência no crescimento intrauterino (CHRISTIAN 2001; MOORE e PERSAUD, 2004; ERGAZ et al., 2005).

A IP como um inibidor da síntese de DNA em células tumorais, poderia diminuir a síntese de DNA durante o desenvolvimento fetal levando a RCIU nos fetos expostos a IP durante a fetogênese. Entretanto, no presente trabalho tamanho, peso corporal e dos órgãos não apresentaram diferença significativa quando comparados aos fetos que não foram expostos a IP na gestação, quer se refiram a fetos de sexo masculino ou a femininos.

Com os dados obtidos pode-se concluir que a administração de 300, 1500 e 3000mg/Kg/dose de suspensão aquosa de Ipriflavona durante o período de fetogênese de ratas não causou toxicidade materna nem alteração no crescimento e desenvolvimento fetal.

#### REFERÊNCIAS:

BONILLA, C.A. 2004. Isoflavonas en ginecología, terapia no convencional. **Revista Colombiana de Obstetricia e Ginecologia**, **55** (3): 209-217.

BURDAN, F. 2003. Intrauterine growth retardation and lack of teratogenic effects of prenatal exposure to the combination of paracetamol and caffeine in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, **17**: 51–58.

CAMPBELL, S. 1976. **Fetal Physiology and Medicine**. W.B. Saunders Company Ltd, London, 271-301.

CEDERROTH, C.R. & NEF, S. 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **304** (1-2): 30-42.

CHAN, W.H.; LU, H.Y. & SHIAO, N.H. 2007. Effect of genistein on mouse blastocyst development in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, **28** (2): 238-245.

CHRISTIAN, M.S. 2001. Test Methods for assessing female reproductive and development toxicology, p. 1301-1381. *In*: Hayes A.W. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis.



ERGAZ, Z.; AVGIL, M. & ORNOY, A. 2005. Intrauterine growth restriction—etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models? **Reproductive Toxicology**, **20**: 301–322.

GARRIDO, A.; DE LA MAZA, M.P. & VALLADARES, L. 2003. Fitoestrógenos dietarios y sus potenciales beneficios en la salud del adulto humano. **Revista Médica de Chile**, **131**: 1321-1328.

IWASAKI, T.; MUKAI, M.; TSUJIMURA, T.; TATSUTA, M.; NAKAMURA, H.; TERADA, N. & AKEDO, H. 2002. Ipriflavone inhibits osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells in a nude mouse model. **International Journal of Cancer**, **100** (4): 381-387.

JEZEK, D. & KOZINA, V. Apoptosis during embryo development. **Acta Médica Croatica**, **63** (2): 37-41.

KATO, H.; MORISHIGE, W.K. & ROTCHILD, I.A. 1979. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteum activity in pregnant rat. **Endocrinology**, **105**: 846-850.

KAVLOCK, R.J.; CHERNOFF, N. & ROGERS, E. 1982. An analysis of fetotoxicity using biochemical endpoints of organ differentiation. **Teratology**, **26**: 183-194.

KHERA K.S. 1984. Maternal toxicity - a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, **29**: 411-416.

KHERA K.S. 1985. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo - fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. **Teratology**, **31**: 129–153.

KHERA K.S. 1987. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders - a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. **Critical Reviews Toxicology**, **17**: 345–375.

LABORDE, J.B.; WALL, K.S. & BOLON, B. 1999 . Hematology and serum chemistry parameters of the pregnant rat. **Laboratory Animals**, **33**, 275- 287.

MANSON, J.M. & KANG, Y. J. 1994. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology.p. 989-1037 In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press.

MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. 2004. **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 609p.

PAUMGARTTEN, F.; SOLECKI, R.; BUSCHMANN, J.; CLARK, R.; GROTE, K.; RAUCH, M. & CHAHOUD, I. 2009. Harmonization of terminology in developmental toxicology: the quest for a more precise description and a harmonized classification of fetal observations. **Reproductive Toxicology** **27**: 8–13.

PINTO, A.S.; TOLEDO, T.O.; DEL CARLO, R.J.; NAGEM, T.J.; FONSECA, C.C.; MORAES, G.H.K.; JUNIOR, D.B.F. & CARDOSO, C.A. 2006. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Revista Brasileira Ciência Farmacológica**, **42** (1): 99-107.

PINTO, R.M.; FERNANDES, E.S.; REIS, J.E.P.; PETERS, V.M. & GUERRA, M.O. 2007. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* to rats. **Reproductive Toxicology**, **23** : 480-485.

RICHTER, D.U.; MYLONAS, I.; TOTH, B.; SCHOLZ, C.; BRIESE, V.; FRIESE, K. & JESCHKE, U. 2009. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on progesterone and estrogen (estradiol) production of human term trophoblast cells in vitro. **Gynecological Endocrinology**, **25** (1): 32-38.

SOSIĆ-JURJEVIĆ, B.; FILIPOVIĆ, B.; AJDZANOVIĆ, V.; BRKIĆ, D.; RISTIĆ, N.; STOJANOSKI, M.M.; NESTOROVIĆ, N.; TRIFUNOVIĆ, S. & SEKULIĆ, M. 2007. Subcutaneously administrated genistein and daidzein decrease serum cholesterol and increase triglyceride levels in male middle-aged rats. **Experimental Biology and Medicine**, **232** (9): 1222-1227.

TANI, S.; MATSUDA, K. & TANAKA, T. 2004. Induction of Apoptosis in Cultured Rat Gastric Epithelial Cells by Ipriflavone: Comparison with Indomethacin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **27** (5): 647-651.

VINCENT, A. & FITZPATRICK, L.A. 2000. Soy isoflavones: are they useful in menopause? **Mayo Clinic Proceedings**, **75**: 1174-1184.

ZHANG, X.; LI, S.W.; WU, J.F.; DONG, C.L.; ZHENG, C.X.; ZHANG, Y.P. & DU, J. 2009. Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis. **Gynecological Endocrinology**, **11**: 1-5.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P. & MEYEROWITZ, E. 1998. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. Porto Alegre: Artmed, 484p.

WU, Z.; YANG, Y.; CHEN, Y.; XIA, G. & ZHANG, R. 2005. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. **Food and Chemical Toxicology**, **43** (1): 167-172.

WU, J.; ZHU, Y. & WU, J. 2008. Effects of estrogen and estrogenic compounds on cognition in ovariectomized rats. **Climacteric.**, **11**(3): 212-220.