

Valéria Romero

**EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL À ISOFLAVONA EM RATOS:
INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO
E EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia).

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Botucatu – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Romero, Valéria.

Exposição pré-natal à isoflavona em ratos: influência no desenvolvimento e em parâmetros reprodutivos / Valéria Romero . – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Assunto CAPES: 21000000

1. Reprodução humana - Aspectos endócrinos

2. Hormonioterapia

3. Farmacologia

CDD 574.1927

CDD 615.76

Palavras-chave: Atividade estrogênica; Embriofetotoxicidade; Isoflavona; Terapia de reposição hormonal; Rato

Dedicatória

A Deus

*“Onipotente, Consciência Suprema”,
Soberano e Supremo Criador de todas as coisas, obrigada pelo dom
de viver e crescer na Tua espiritualidade.*

*“Deus, dai-nos a força de subirmos até vós, dai-nos a caridade
pura, dai-nos a fé e a razão, dai-nos a simplicidade e a humildade
que fará de nossas almas o espelho onde se refletirá Vossa divina
imagem”.*

(Prece de Caritas)

Ao Meu Marido Emanuel,

*Pelo privilégio de ter você ao meu
lado sempre me apoiando.*

*Pelas vezes que estive
sobrecarregada e você dividiu as
tarefas.*

*Pela compreensão e respeito nos
momentos em que estive ausente.*

*Pelas vezes que estive estressada e
você me trouxe calma.*

*Pelas nossas conversas, nossos
momentos de alegria e
descontração.*

*Por me presentear todos os dias
com o seu amor, carinho e doação...*

Amo você!

Aos meus pais Maria Aparecida e Valério, que muitas vezes renunciaram os seus sonhos para realizarem os meus, por me amarem.

Às minhas irmãs Mara e Meire e minha sobrinha Mayara, pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus cunhados e irmãos Luís Carlos "in memoriam" e Valdir, por serem pessoas tão maravilhosas, exemplos de vida e superação.

À minha mãe adotiva Dra. Efigênia Santana, pela presença sublime em minha vida, por todo apoio, incentivo, amizade e carinho.

Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira, pelos ensinamentos, apoio, sugestões e críticas que muito contribuíram para a minha formação científica e desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

Pela confiança e por acreditar que mesmo com o meu trabalho, eu alcançaria esta vitória.

Agradecimientos

Ao Departamento de Farmacologia e ao Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À Universidade do Sagrado Coração, em especial à Irmã Marisabel Leite por todo apoio e confiança, pela oportunidade concedida para a realização dos experimentos.

Ao Departamento de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde, em especial à Ana Daher e à Profa. Ms. Rute Mendonça, pela amizade e apoio na montagem dos meus horários de aula.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação profissional.

À Profa. Dra. Maricê Domingues Heubel pela amizade, pelo apoio e por autorizar a realização dos meus experimentos no laboratório de pesquisa experimental.

Aos mestrandos e amigos Cynthia Dela Cruz, Isabel Meneghetti e Geraldo Rosa, pela amizade sempre presente,

pelo carinho e companheirismo, por todo apoio na realização dos experimentos, amo vocês. À amiga Patrícia Conde pela amizade e apoio sempre presente.

Aos amados amigos Edson e Régis pelo incentivo e compreensão nos momentos em que estive ausente e ao amigo anjo Marcelo pela amizade, apoio e carinho ao me hospedar na sua casa. A amiga Larisa Waldige pela amizade e revisão do meu abstract.

Aos funcionários do Biotério em especial ao bioterista Sérgio, Laboratório de Biologia e Química da Universidade do Sagrado Coração, pela amizade e contribuição para a realização dos experimentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e amigos de laboratório, Cynthia, Daniela, Fábio, Patrícia e Renata, pela ajuda e amizade nestes anos.

À Luna pela alegria e amor, por me proporcionar a lichoterapia.

À Biblioteca da UNESP, Campus de Botucatu, pela Revisão Bibliográfica e elaboração da Ficha Catalográfica.

Aos meus alunos e ex-alunos por cada dia de aula e convivência em que ao ensinar estou aprendendo ainda mais, em especial à aluna Bruna Dallaqua pela amizade e apoio sempre presente.

A todos os animais que cedem suas vidas para a realização de trabalhos científicos.



Lista de Abreviaturas

DMSO	Dimetilsulfóxido
GD	Dia Gestacional
PND	Dia Pós Natal
RE	Receptores de Estrogênio
TRH	Terapia de Reposição Hormonal

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Desenvolvimento corporal de ratas pré-púberes ao longo do tratamento.....	31
Tabela 2.	Ganho de massa corporal (g) de camundongos machos após 30 dias de tratamento com isoflavona.....	32
Tabela 3.	Peso úmido dos órgãos e glândulas sexuais.....	33
Tabela 4.	Ganho de massa corporal (g) de camundongos fêmeas após 30 dias de tratamento com isoflavona.....	34
Tabela 5.	Peso úmido e relativo do útero e ovário.....	35
Tabela 6.	Massa Corporal (g) das Progenitoras durante a Gestação.....	36
Tabela 7.	Período gestacional	37
Tabela 8.	Parâmetros gestacionais	38
Tabela 9.	Taxas de Perdas Pré e Pós Implantação (%)	39
Tabela 10.	Desenvolvimento corporal pós-natal (peso em g) dos filhotes machos, do nascimento ao 21º dia de vida	40
Tabela 11.	Idade (dias) por ocasião do surgimento de pêlos, abertura dos olhos, descolamento de orelhas, descida testicular e separação prepucial	41
Tabela 12.	Desenvolvimento corporal pós-natal (peso em g) dos filhotes fêmeas, do nascimento ao 21º dia de vida.....	43
Tabela 13.	Idade por ocasião do surgimento de pêlos, abertura dos olhos, descolamento de orelhas, abertura vaginal.....	44
Tabela 14.	Avaliação do ciclo estral de ratas dos grupos Controle, Isoflanova 10mg/kg, Isoflavona 100mg/kg	45

Lista de Figuras

Figura 1. Teste uterotr3fico de ratas com 21 dias dos grupos: Controle ($0,05 \pm 0$), Benzoato de Estradiol ($0,12 \pm 0,01$), Isoflavona 3,3mg/kg ($0,05 \pm 0$), Isoflavona 10mg/kg ($0,07 \pm 0$), Isoflavona 33,3mg/kg ($0,07 \pm 0$), Isoflavona 100mg/kg ($0,07 \pm 0$) e Isoflavona 300mg/kg ($0,07 \pm 0$) 32

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVO	13
MATERIAL E MÉTODOS	15
1. Animais	16
2. Drogas e Reagentes	16
3. Determinação da dose de isoflavona com atividade estrogênica	17
4. Tratamento das ratas prenhes com extrato de isoflavona	19
5. Evolução da prenhez e parâmetros determinados	22
6. Estudo do ciclo estral	26
7. Análise estatística	29
RESULTADOS	30
1. Determinação da dose de isoflavona com atividade estrogênica	31
2. Parâmetros maternos determinados a partir do emprego das doses eleitas de Isoflavo	35
3. Avaliação dos descendentes machos e fêmeas	39
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	58
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXOS	70

Resumo

A soja e seus derivados (ricos em isoflavona) têm sido cada vez mais prescritos por médicos como uma alternativa terapêutica à Terapia de Reposição Hormonal e vêm sendo amplamente adotados como parte da dieta da população. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos desejáveis ou indesejáveis que este produto natural pode oferecer. A soja contém alta concentração de isoflavona e esta, por sua vez, é composta por uma mistura de substâncias. Dentre as principais estão a genistéina e a daidzeína. A isoflavona, classificada como fitoestrogênio, apesar de apresentar fraca atividade estrogênica é capaz de interferir no desenvolvimento corporal e sexual, ocasionando alterações reprodutivas. Por esta razão pode ser apontada como um possível desregulador endócrino. Desta forma, o objetivo do presente trabalho constituiu eleger dose de isoflavona com atividade estrogênica e estudar suas ações em ratas prenhes, avaliando sua possível repercussão sobre o desenvolvimento dos conceptos, bem como sobre parâmetros reprodutivos. Para eleição de dose com atividade estrogênica foi realizado o teste uterotrófico em ratas pré-púberes. Observamos que a isoflavona nas doses 10mg/Kg e 100mg/Kg apresenta atividade estrogênica. A atividade estrogênica da isoflavona foi também identificada em camundongos pré-púberes machos e fêmeas. As doses eleitas de isoflavona com atividade estrogênica, 10mg/Kg e 100mg/Kg, foram administradas por via intragástrica a ratas prenhes Wistar, diariamente, a partir do 6º dia de gestação até o seu final. As ratas prenhes expostas à isoflavona nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg, quando laparotomizadas, apresentaram menor número de fetos vivos, enquanto o número de fetos em lise apresentou-se maior em ratas expostas à isoflavona na dose de 100mg/Kg. Apresentaram também maior número de sítios de reabsorção e menor número de sítios implantados. Aumento nas taxas de perdas pré-implantação foi observado nas doses 10mg/Kg e 100 mg/Kg, enquanto para as taxas de perdas pós-implantação foi observado aumento apenas com a dose de 100mg/Kg. Nas ratas que tiveram evolução normal da prenhez, não observamos toxicidade materna, apesar de apresentarem uma antecipação significativa no dia do nascimento dos filhotes. As ratas pertencentes aos grupos

Isoflavona 10mg/Kg e 100mg/Kg pariram menor número filhotes/ninhada. Os parâmetros surgimento de pêlos, abertura dos olhos, o descolamento das orelhas e a idade por ocasião da instalação da puberdade ocorreram mais precocemente, em ambos os sexos. Nos descendentes fêmeas, em relação ao ciclo estral, apesar de não observarmos diferença quanto ao número de estros, verificamos um aumento em sua duração com Isoflavona na dose de 10mg/Kg. Portanto, a isoflavona, em diferentes modelos experimentais, apresentou atividade estrogênica. Desta forma, apesar da recomendação indiscriminada do uso da soja e seus derivados, os resultados, deste estudo mostraram também que esta conduta não é totalmente isenta de efeitos indesejáveis. Cautela deve ser tomada até que estudos mais extensos sejam realizados, avaliando os possíveis efeitos tardios do consumo da soja e seus derivados, em especial a isoflavona em períodos críticos do desenvolvimento bem como sua participação e/ou implicação no sexo masculino.

Abstract

Soybean and its derivatives (rich in isoflavone) have been more and more prescribed by doctors as a therapeutic alternative to the Hormone Replacement Therapy and have been widely adopted as a part of the population's diet. However, there is a relative paucity of information about the desirable or undesirable effects, which this natural product can provide. Soybean contains a high concentration of isoflavone, which is composed by a mixture of substances. Daidzein and genistein are within the major substances of this composition. The isoflavone, classified as a phytoestrogen, despite of presenting a low estrogenic activity is capable of interfering in the sexual and body development, leading to reproductive alterations. So that it could be referred as a possible endocrine disrupter. Thus, the objective of the present study was to determine the isoflavone dosage with estrogenic activity and review its actions on pregnant rats, assessing its possible repercussion on the conceptus development, as well as on the reproductive parameters. Aiming to determine the dosage with estrogenic activity, an uterotrophic test was realized in the pre-puberty rats. We observed that the 10mg/Kg and 100mg/Kg of isoflavone dosages present estrogenic activity. The estrogenic activity of the isoflavone was also identified in pre-puberty male and female mice. The determined dosages of isoflavone with estrogenic activity, 10mg/Kg and 100mg/Kg, were intragastric applied in Wistar pregnant rats, on daily basis, from the sixth gestation day up to its end. The pregnant rats exposed to 10mg/Kg and 100mg/Kg of isoflavone dosages presented a smaller number of living fetus when laparotomized, while the number of fetus undergoing dissolution was higher in rats exposed to 100mg/Kg isoflavone dosages. They also presented a higher number of reabsorption sites and a smaller number of implanted sites. The pre-implantation loss rates were observed in the 10mg/Kg and 100mg/Kg isoflavone dosages, while the post-implantation loss rates were verified just in the 100mg/Kg dosage. The rats in which a regular pregnancy development was verified, we didn't observe maternal toxicity, despite of presenting a significant anticipation of the offspring birth date. The rats belonging to the 10mg/Kg and 100mg/Kg isoflavone dosage group

gave birth to a smaller number of subjects/offspring. The parameters for appearing pelage, eyes opening, ears releasing and the age for the beginning of puberty were more precocious in both genders. In the female descendant, concerning the estrus cycle, despite of observing no difference related to the number of estrus, we verified an increase in its duration with the 10mg/Kg isoflavone dosage. Therefore, the isoflavone, in various experimental models, presented estrogenic activity. So that, spite of the indiscriminate recommendation for using soybean and its derivates, the results of this study also showed that this procedure isn't totally free from undesirable effects. We must be cautious until more extended studies are realized assessing the possible late effects of the soybean consumption and its derivates, specially the isoflavone in critical periods of the development as well as its participation and/or implications concerning the male gender.

Introdução

Normalmente, entre os 40 e 50 anos de idade, os ciclos sexuais da mulher ficam irregulares, não havendo ovulação em muitos deles ou mesmo a produção de estrógenos pelos ovários. Após meses ou anos esses ciclos cessam totalmente. Essa cessação é denominada menopausa. Os estrógenos passam a ser produzidos em quantidades cada vez menores e após alguns anos esta produção pode não ocorrer mais, sendo muitas vezes necessária à reposição hormonal. Nas últimas duas décadas, as pesquisas têm privilegiado a busca de terapias capazes de aliviar os sintomas indesejáveis associados às quedas nos níveis de hormônios da reprodução, sobretudo o desenvolvimento de compostos farmacêuticos de hormônios sintéticos (VIGETA *et al.*, 2004). Assim, a terapia de reposição hormonal (TRH) é recomendada para o alívio dos sintomas vasomotores, tratamento da atrofia vaginal e prevenção da osteoporose. Apesar das conhecidas vantagens, muitas mulheres cessam o tratamento de TRH após apresentarem um quadro de cefaléia, mastalgia, náusea, ganho de peso e retenção hídrica, além do receio de câncer de mama (ANELLI *et al.*, 2003).

Na TRH, os hormônios mais utilizados incluem os estrogênios e os progestógenos semi-sintéticos. Existem diversas maneiras de se administrar o estrógeno: via oral, via transdérmica, via vaginal, e injetável. No Brasil as vias mais utilizadas são a transdérmica e a oral, tendo sido lançado recentemente o implante subcutâneo. O estradiol, administrado por via oral, é rapidamente metabolizado pelo fígado em estrona e seus conjugados, levando a concentrações circulantes mais elevadas de estrona do que estradiol. Em contraste, a pele metaboliza em pequeno grau. Pesquisa demonstrou também que mulheres pós menopáusicas que recebem terapia oral ou transdérmica obtêm os efeitos terapêuticos desejados, ou seja, menores níveis de gonadotropina, menores porcentagens de células parabasais vaginais, diminuição da excreção de cálcio e menor proporção entre cálcio e creatinina, com ambos os tipos de formulação. O estudo demonstrou também que os efeitos colaterais sistêmicos dos estrogênios orais podem ser reduzidos pelo uso da via transdérmica (ANSEL *et al.*, 2000).

Devido aos efeitos colaterais observados na TRH, há grande interesse no desenvolvimento de terapêuticas alternativas. Assim, uma terapêutica que tem sido atualmente prescrita é a substituição de hormônios sintéticos ou semi-sintéticos; estrogênios e os progestógenos pelos fitoestrogênios. A ação estrogênica ou antiestrogênica de algumas substâncias derivadas de plantas é conhecida há algumas décadas e, por esta razão, são denominadas fitoestrogênios. No grupo de substâncias com atividade estrogênica encontramos um importante derivado da soja, a isoflavona. O aparecimento da soja remonta a mais de cinco milênios na região da Coréia e Manchúria. Hoje no sudeste asiático, a soja representa 20 a 60% da proteína ingerida pela população (HAN *et al.*, 2002). A isoflavona, importante fitoestrógeno, é encontrada, além de no grão de soja, em brotos de alfafa, sementes de linhaça, trevo vermelho, entre outros vegetais. Na soja, as isoflavonas estão distribuídas em todo o grão, tendo maior concentração no gérmen do grão da soja (CLAPAUCH *et al.*, 2002).

A isoflavona apresenta estrutura similar ao estradiol e tem recebido atenção como uma alternativa para TRH, para a prevenção da pós-menopausa e osteoporose (FUJIOKA *et al.*, 2004). Os flavonóides apresentam atividade antiviral, anticarcinogênica, bactericida, antifúngica, antioxidante, antimutagênica, antihipertensiva, antiinflamatória, antiproliferativa e antioosteoporose (MARTIN *et al.*, 1978, KONDO *et al.*, 1990, KNIGHT *et al.*, 1996, WUTTUKE, 2006). As isoflavonas são conjugadas com a glicose, formando glicosídeos. No gérmen da soja os principais glicosídeos encontrados são a daidzeína, genisteína e gliciteína, sendo que os dois primeiros são os mais encontrados, predominando a genisteína que corresponde a 75% do total. Esses compostos são fermentados pela microflora intestinal; a daidzeína é metabolizada a íquol ou O-dimetilangolesina (O-Dma), a p-etilfenol. Daidzeína, genisteína e íquol são os principais fitoestrógenos encontrados no sangue e urina de homens e animais (MORAIS *et al.*, 2000). Vários medicamentos contêm princípios ativos extraídos de plantas, sendo modificados quimicamente em laboratório para

potencializar sua atividade, aumentar a biodisponibilidade ou diminuir os efeitos adversos (CLAPAUCH *et al.*, 2002).

Afirma a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, que as isoflavonas são consideradas medicamentos, com obrigatoriedade de registro e cumprimento dos requisitos de segurança, eficácia e qualidade, não se enquadrando na legislação brasileira de alimentos pela resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Todavia isto nem sempre é observado.

O efeito biológico dos isoflavonóides varia de acordo com a fase biológica da mulher. Na pré-menopausa, quando a concentração de hormônios circulantes é alta, os receptores de estrógenos estão ocupados e os fitoestrógenos competem por estes sítios. Como tem menor atividade biológica que os estrógenos endógenos, resultam apenas uma fraca ação anti-estrogênica. Em mulheres na pós-menopausa, a concentração do estrógeno endógeno circulante diminui 60%; os receptores estarão mais disponíveis, favorecendo a fraca ação estrogênica dos flavonóides (CHAMBÔ-FILHO *et al.*, 2000). De acordo com Clapauch *et al.* (2002) a propriedade estrogênica e antiestrogênica dos fitoestrógenos depende da concentração dos mesmos, da concentração dos esteróides sexuais endógenos e do órgão alvo específico envolvido na interação com os receptores de estrogênios (RE). Esse efeito pode ser explicado pela existência de dois tipos de RE: α e β . Os α -receptores (RE- α) são os principais receptores encontrados na mama e no útero, e os β -receptores (RE- β) no osso e no sistema cardiovascular. O estradiol tem afinidade por ambos receptores, enquanto as isoflavonas são mais seletivas para os RE- β , a proporção de 1/20 para o α e 1/3 para o β .

As isoflavonas incluem a genisteína, daidzeína, gliciteína, biochanina A e formononetina. Na maioria das plantas são encontradas na forma de glicosídeos (genistina e daidzeína), isto é, ligadas a uma molécula de açúcar. No intestino, onde a genistina é metabolizada por ação de enzimas bacterianas, perde o resíduo de açúcar e transforma-se na forma mais ativa, que é agliconada (genisteína). Os

isoflavonóides provenientes de matéria-prima já processada, que passam por um processo de fermentação, proporcionam maior teor de agliconas, como por exemplo, o missô e o molho de soja. Já a extração alcoólica da farinha de soja remove todas as pequenas moléculas orgânicas, inclusive os fitoestrógenos (COWARD *et al.*, 1993)

Segundo Fujioka *et al.*, (2004) as isoflavonas possuem uma fraca afinidade ao receptor de estrogênio, por esta razão são chamadas de fitoestrogênios. São compostos não-esteróides, que se ligam fracamente aos receptores estrogênicos (menos que 1% da afinidade de ligação do estradiol). Existem evidências de que a isoflavona diminui a intensidade e a frequência dos sintomas vasomotores em mulheres na menopausa. A maioria dessas observações sobre o uso dos fitoestrogênios são epidemiológicas, muitas delas baseadas em estudos realizados em regiões de alto consumo da soja. Notou-se que menos de 20% das mulheres japonesas apresentam ondas de calor, comparado com 80% das européias, atribuindo-se, em parte, estas diferenças à dieta das mulheres japoneses, rica em derivados da soja (ANELLI *et al.*, 2003). Em estudo duplo-cego, com placebo controlado, constatou-se que 60g/dia de proteína isolada da soja (suplemento alimentar) foi superior ao placebo, reduzindo em 50% os sintomas vasomotores (ALBERTAZZI *et al.*, 1998). Para Han *et al.* (2002), a isoflavona mimetiza algumas das ações dos estrogênios naturais, pois ao atuar nos receptores de estrogênio, melhora os sintomas indesejáveis da síndrome do climatério. Entretanto, faltam trabalhos consistentes na literatura que demonstrem que os efeitos da isoflavona sejam realmente semelhantes aos do estrogênio.

Estudos mostraram também que mulheres ao consumirem quantidades elevadas de produtos ricos em isoflavona da soja apresentam concentrações urinárias maiores de isoflavona, reduzindo o risco e as taxas do câncer de mama (DUNCAN *et al.*,1999). Assim, o consumo de isoflavonas é também sugerido por essa possível propriedade câncer-preventiva.

Considerando-se então os benefícios acima relatados, vem sendo recomendada a adição da isoflavona, proveniente do gérmen da soja, à dieta da população. A população brasileira tradicionalmente não consome soja, o óleo de soja, que apresenta contribuição efetiva na dieta brasileira, não contém isoflavonas. Desta forma, o desenvolvimento de produtos enriquecidos com derivados de soja seria uma alternativa para aumentar a presença dessas substâncias na dieta (BEDANI e ROSSI, 2005). Verificamos, porém, uma grande dificuldade em se modificar o hábito alimentar da mulher ocidental. Desta forma, um dos recursos muito utilizados vem consistindo na administração do princípio ativo, por via oral. Todavia a ocorrência de efeitos adversos quando do uso continuado da isoflavona, por sua atividade estrogênica, continuam por ser dimensionados e/ou melhor estudados.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar as atividades da isoflavona em ratas prenhes e sua possível repercussão sobre o desenvolvimento dos conceptos, bem como sobre parâmetros reprodutivos.

Objetivos Específicos

1. Realizar um *screening* utilizando a isoflavona em ratos (fêmeas) e camundongos (machos e fêmeas) pré-púberes para eleição de dose com atividade estrogênica a ser administrada em ratas prenhes;
2. Avaliar a atividade e toxicidade da isoflavona no desenvolvimento da prenhez;
3. Analisar o desenvolvimento e parâmetros reprodutivos dos descendentes machos e fêmeas expostos à isoflavona, *in útero*, até a vida adulta.

Material e Métodos

1. Animais

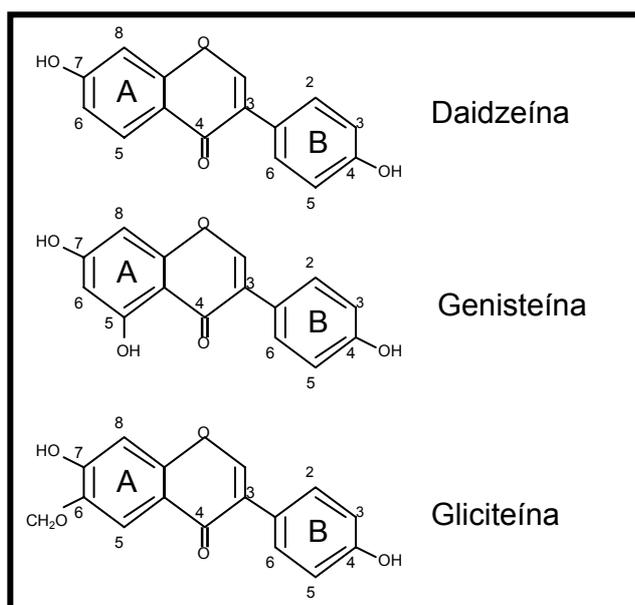
Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos e fêmeas, e camundongos albinos Swiss, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da USC de Bauru. Os animais foram mantidos em salas apropriadas, com exaustão e temperatura controlada ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), obedecendo a um ciclo claro/escuro de 12 horas. É descrito que muitas rações normalmente empregadas para criação e manutenção de animais em biotério apresentam resíduos de isoflavonas na sua composição (DIEL *et al.*, 2001). Os animais do presente estudo receberam, à vontade, água filtrada e ração comercial que não apresentava em sua composição nenhuma substância que contivesse soja ou seus derivados.

2. Drogas e reagentes

- Extrato seco de isoflavona (Galena Química e Farmacêutica Ltda) *
- 17 β -Benzoato de Estradiol (Sigma, Co., USA)
- Cloridrato de ketamina (Dopalen, Laboratório Vetbrands)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Laboratório Merck S. A
- Propilenoglicol - Laboratório Merck S. A

* Especificação: laudo anexo.

Estrutura Química – principais isoflavonas da soja (MESSINA, 1999)



3. Determinação da dose de isoflavona com atividade estrogênica

3.1 Teste uterotrófico - *Screening* para verificar possível atividade estrogênica de diferentes concentrações de extrato seco de isoflavona, de acordo com Andrade *et al.* (2002).

O teste uterotrófico é utilizado na triagem de substâncias com atividade estrogênica, recomendado pelo Comitê Consultivo de Testes e Triagem de Substâncias Desreguladoras Endócrinas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. O aumento na massa do útero é considerado a melhor variável indicativa de estrogenicidade *in vivo* quando medido em ratas ovariectomizadas ou imaturas após três dias de tratamento (EDSTAC, 1998). O teste uterotrófico permitiu então avaliar o provável potencial estrogênico do extrato seco de isoflavona.

Aos 21 a 22 dias de idade, ratas fêmeas provenientes de diferentes mães foram separadas randomicamente para o teste uterotrófico. Os animais receberam por via oral (gavage) 0,15 ml de veículo (DMSO + propilenoglicol) ou a droga (benzoato de estradiol ou isoflavona) contida em 0,15 ml de veículo, por três dias consecutivos (21º ou 22º ao 24º ou 25º dias pós-natal, respectivamente). Um total de 49 ratas, 7 ratas para cada grupo experimental, recebeu a droga ou veículo por via oral, conforme segue:

- Controle Negativo (DMSO + propilenoglicol v/v, durante 3 dias consecutivos);
- Controle Positivo (Benzoato de Estradiol, 0,4mg/Kg/dia, durante 3 dias consecutivos);
- Extrato de isoflavona 3,3 mg/Kg/dia; 10,0 mg/Kg/dia; 33,3 mg/Kg/dia; 100 mg/Kg/dia ou 300mg/Kg/dia durante 3 dias consecutivos.



NOTA: Introdução de sonda no trato digestivo para tratamento via oral.

No 24° ou 25° dia de vida pós-natal, depois de pesadas, as ratas dos diferentes grupos experimentais foram mortas por overdose de cloridrato de ketamina. Após laparotomia exploratória, o útero foi identificado e retirado, mediante secção logo acima com da junção com a cérvix e na junção dos cornos uterinos com os ovários. A seguir procedeu-se uma cuidadosa dissecação para a retirada da gordura e vasos sanguíneos adjacentes. Finalmente, o útero foi então perfurado e colocado entre duas folhas de papel absorvente para a retirada do líquido retido e então pôde ser medida sua massa. A massa do útero foi reportada percentualmente em relação à massa corporal (massa relativa).

3.2. Teste para determinação da atividade estrogênica em camundongos machos e fêmeas

Para a determinação da dose de isoflavona com atividade estrogênica, foi avaliado o desenvolvimento de camundongos machos e fêmeas, do 28° até o 58° dia de idade, com livre acesso à água enriquecida com extrato seco de isoflavona (3,3mg/100mL ou 100mg/100mL) de acordo com Oshima *et al.*(2003).

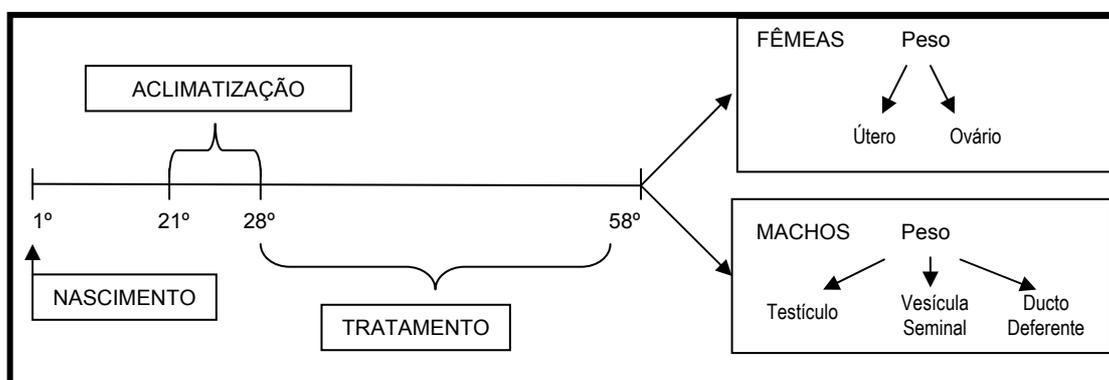
Foram utilizados camundongos, sendo 18 machos e 18 fêmeas, com 3 semanas de idade, pesando de 10 a 12g. Após o desmame, foram aclimatados durante uma semana, 6/gaiola (machos ou fêmeas) para posterior estudo à 4ª semana de idade, ocasião em que tiveram o peso corporal determinado para

posterior comparação, após 30 dias de tratamento. Ao final da aclimatação, o grupo Controle, com 6 camundongos, recebeu, em bebedouro usual, veículo (água + propilenoglicol + DMSO). Os grupos testes, com 6 camundongos receberam em bebedouro usual, água enriquecida com 3,3mg ou 100mg de isoflavona/100mL (Isoflavona solubilizada em propilenoglicol + DMSO), por 30 dias. Igual procedimento foi realizado com as fêmeas

Ao final do tratamento, portanto aos 58 dias de idade, os animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados e mortos por overdose de cloridrato de ketamina para identificação, isolamento, retirada e determinação do peso úmido dos órgãos acessórios da reprodução.

Para os machos foram determinados os pesos úmidos dos testículos, vesícula seminal e ducto deferente. Para as fêmeas foram determinados os pesos úmidos dos ovários e útero.

Delineamento Experimental



4. Tratamento das ratas prenhes com extrato de isoflavona

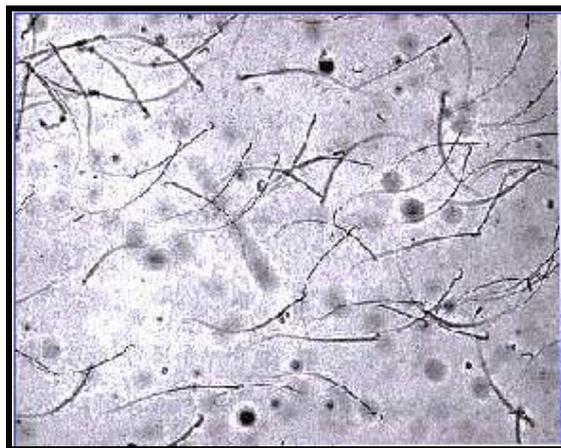
Para a obtenção dos grupos experimentais, foram colocadas para acasalar, em gaiolas coletivas, no final da tarde, duas ratas fêmeas adultas nulíparas e ciclando normalmente (massa média 220g) com um rato macho adulto, comprovadamente fértil. Na manhã seguinte, o macho foi retirado da gaiola das

fêmeas e então foram coletadas células da mucosa vaginal, com o auxílio de algodão autoclavado, aderido a uma haste flexível, previamente embebido em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Quando da coleta do material vaginal tomou-se o devido cuidado de não estimular o cérvix, evitando assim a indução de pseudo-prenhez.

Os fatores indicativos da prenhez foram: presença de espermatozóides e a determinação da fase de estro do ciclo estral (fase estrogênica máxima, onde se encontram apenas células queratinizadas). Este foi considerado o 1º dia de gestação. As fêmeas prenhes foram, então, identificadas e divididas randomicamente em três grupos experimentais, tendo seu peso corporal acompanhado até o 22º dia de prenhez.

Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos. As ratas prenhes foram mantidas em caixas coletivas, de polipropileno (414 x 344 x 168 mm), sendo quatro por caixa, até o 18º dia de gestação (GD18), ocasião em que foram mantidas individualmente.

Lâmina com Espermatozóides



NOTA: Espermatozóides de rato obtidos do esfregaço vaginal após casamento. Exame a fresco - aumento de 200x em microscopia óptica.

4.1 Grupos experimentais

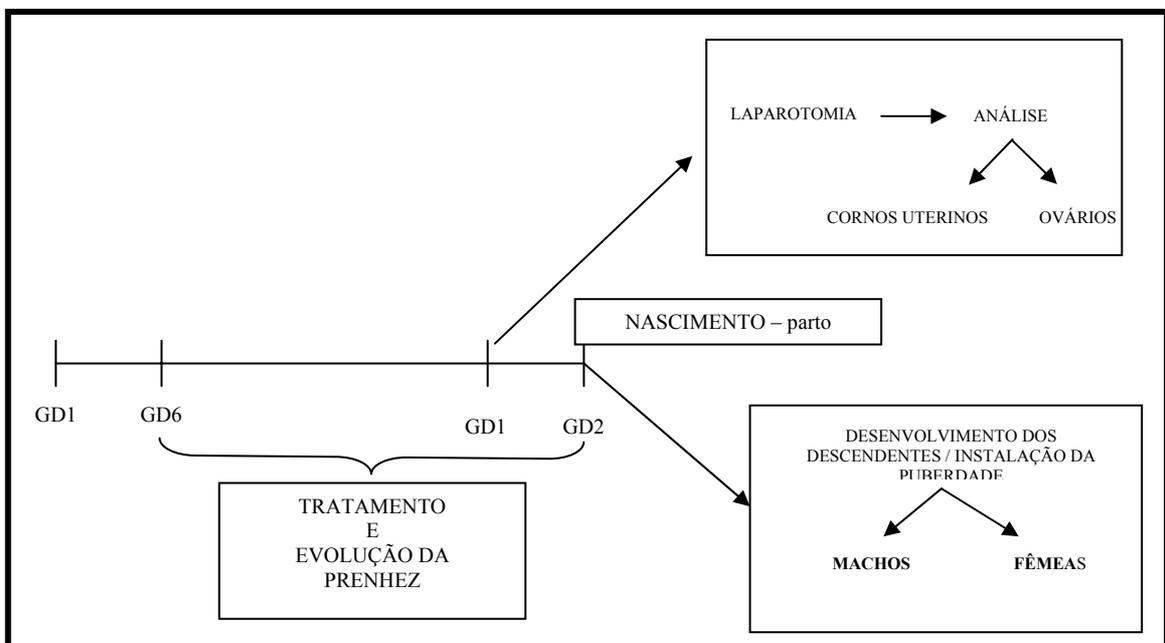
4.1.1 Grupo controle

Ratas prenhes receberam manipulação semelhante ao grupo tratado com isoflavona, sendo administrado, porém apenas o veículo, por gavagem. Igual número de ratas prenhes recebeu apenas a simulação da gavagem (a cânula foi introduzida via intragástrica, com ausência de veículo ou droga). Considerando que todos os resultados obtidos nestes dois grupos não apresentaram diferença significativa, eles foram agrupados e formaram o grupo Controle.

4.1.2 Grupos Isoflavona (10mg/Kg e 100 mg/Kg)

Filhotes de ratas prenhes que receberam oralmente, por gavagem, uma vez ao dia do GD6 ao GD21 10mg/Kg ou 100mg/Kg de isoflavona.

Delineamento Experimental

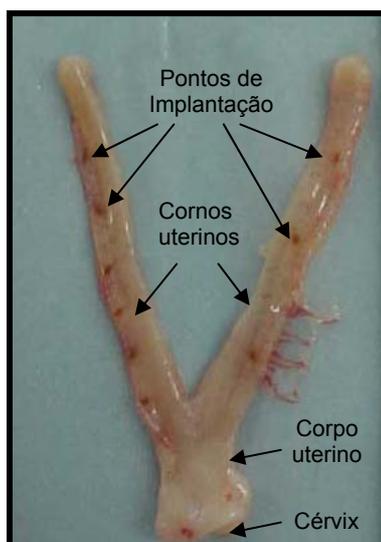


GD: dia gestacional

5. Evolução da prenhez e parâmetros determinados

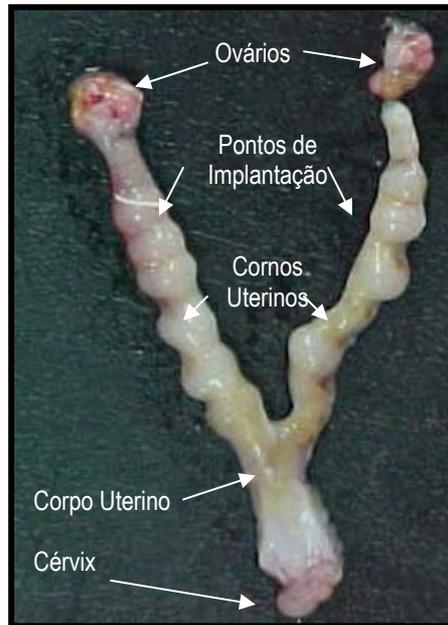
O tratamento das progenitoras teve início no sexto dia da gestação (GD 6) e seguiu até o 21º dia de gestação. Procurou-se evitar assim efeito da isoflavona sobre a implantação do ovo no útero (perda pré-implantação), que em ratos acontece cinco a seis dias após a fecundação (BERNARDI *et al.*, 2002).

Útero de rata prenhe



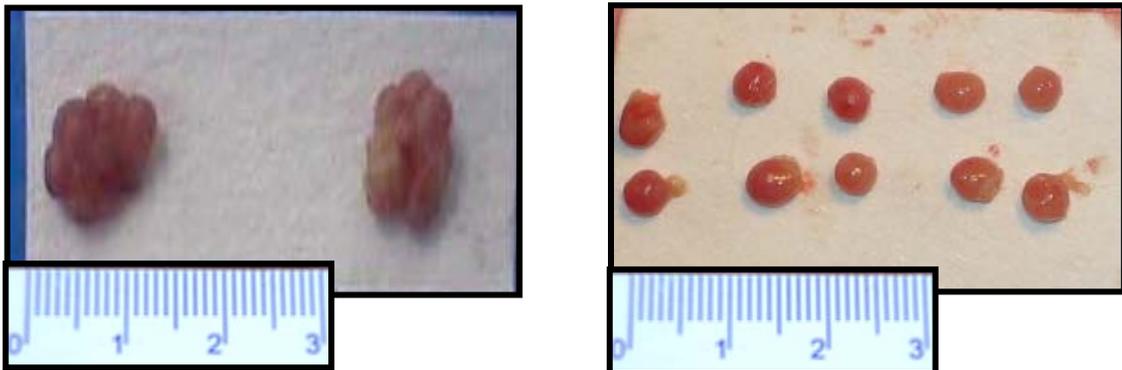
Entre o 19º e 20º dia de prenhez, 20 ratas/grupo foram mortas por overdose de cloridrato de ketamina, seguida de seção dos grandes vasos cervicais. A seguir foram laparotomizadas para análise dos ovários e cornos uterinos. Foi, então, estabelecido o número de implantações (fetos vivos, fetos em lise e sítios de reabsorção). Quando necessário foi realizada a técnica de coloração dos cornos uterinos com o reativo de Salewsky, uma preparação de sulfeto de amônia a 10% (SALEWSKY, 1964) que permitiu a visualização de reabsorções ocorridas em estágios iniciais de implantação.

Implantes Uterinos



NOTA: Úteros com pontos de implantação fetal

Análise dos Ovários e Corpos Lúteos



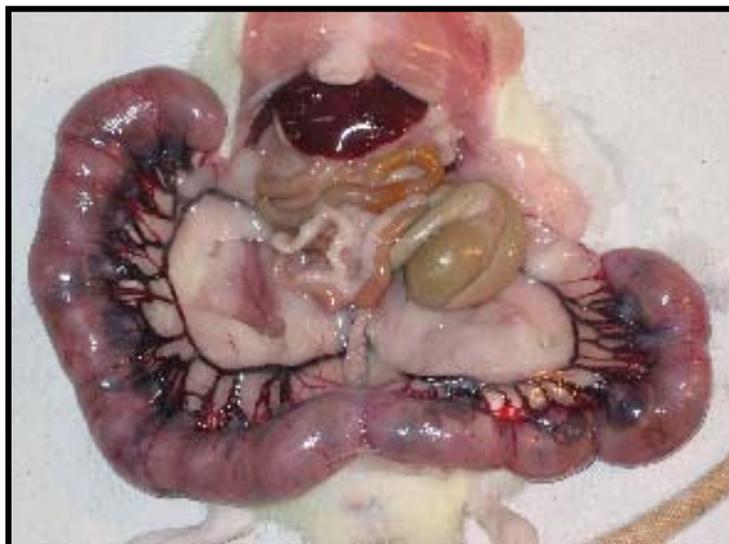
NOTA: Os ovários foram retirados e analisados entre o 19º e 20º dias de gestação e seus corpos lúteos contados.

Os ovários foram isolados e os corpos lúteos separados e contados. A partir da contagem das implantações e dos corpos lúteos, foram obtidos os seguintes parâmetros:

$$\text{Taxa de perda pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de perda pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}} \times 100$$

Rata Prenhe



NOTA: Observação do útero gravídico de rata, através da laparotomia exploratória.

As demais ratas prenhes tiveram a evolução normal da prenhez e tiveram seus filhotes por parto normal. O dia do parto foi designado como primeiro dia pós-natal (PND 1). As fêmeas que estavam parindo no momento da administração da última dose do tratamento, não o receberam. Após o nascimento da ninhada foi realizada a determinação do sexo e padronização das ninhadas para oito, quatro machos e quatro fêmeas, sempre que possível. A determinação do sexo dos filhotes foi feita através da observação visual da distância ano-genital, maior para os machos.

A razão sexo foi então determinada, levando-se em consideração a seguinte fórmula:

$$\text{razão sexo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes machos}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes fêmeas}}$$

A massa corporal de cada progenitora foi registrada a cada 4 dias, desde o início da gestação (GD1) até o fim da lactação (PND 21). Foi também avaliada a duração da prenhez e a manifestação de algum sinal de toxicidade (diarréia, piloereção, tremores, salivação, convulsões, etc). Para obtenção de dados da prenhez, foram registrados: o número de filhotes nascidos (tamanho da ninhada),

a proporção de filhotes nascidos vivos (índice de nascimento), a sobrevivência durante a lactação (índice de viabilidade e desmame e a proporção entre machos e fêmeas (razão sexo). No dia do desmame (22º dia pós-natal) as progenitoras foram mortas por anestesia com éter. As progenitoras que não pariram até o 23º dia de gestação foram sacrificadas para avaliação do útero quanto à presença de implantes uterinos.

Anestesia



NOTA: Rata sendo anestesiada via intraperitoneal.

Durante a lactação, a massa corporal de cada filhote foi registrada nos dias 1, 7, 14 e 21 pós-natal. Todos os filhotes foram examinados diariamente para registrar as variáveis de desenvolvimento geral; dia para deslocamento bilateral das orelhas, surgimento de pêlos e abertura bilateral dos olhos. A partir do 14º dia pós-natal, os descendentes masculinos foram examinados para registro da descida bilateral dos testículos, que foi avaliada através da palpação diária da bolsa escrotal.

Por ocasião do desmame (PND22) os filhotes de cada ninhada foram separados conforme o sexo e identificados para a determinação da idade por ocasião da instalação da puberdade.

Amamentação



NOTA: Rata em período de amamentação.

A partir do 40^o dia de vida pós-natal os descendentes machos foram examinados diariamente até se verificar a completa separação prepucial, indicativa de instalação da puberdade, ocasião em que os animais foram pesados.

A partir do 30^o dia de vida pós-natal as descendentes fêmeas foram observadas quanto à abertura vaginal, que foi considerada quando o óstio vaginal encontrou-se completamente aberto, indicativo de instalação da puberdade, ocasião em que os animais foram pesados.

6. Estudo do ciclo estral

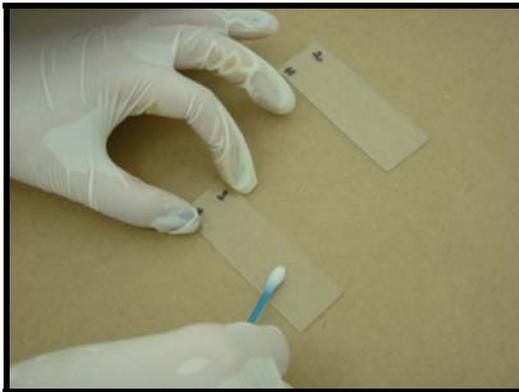
O ciclo estral foi acompanhado a partir do 70^o de vida pós-natal de cada rata. Foram coletadas células da mucosa vaginal com auxílio de algodão autoclavado, aderido a uma haste flexível, previamente embebido em solução fisiológica (NaCl 0,9%), durante 15 dias consecutivos (sempre no mesmo horário). As lâminas foram observadas ao microscópio óptico “Zeiss” (aumento 10/0,25x6,3). Na coleta do material (células da mucosa vaginal) cuidou-se para não estimular o cérvix, evitando assim, a indução de uma possível pseudo-prenhez.

Citologia Vaginal



NOTA: Utilização de haste flexível com cabeça de algodão umedecida com solução fisiológica para coleta das células do epitélio vaginal.

Lâmina

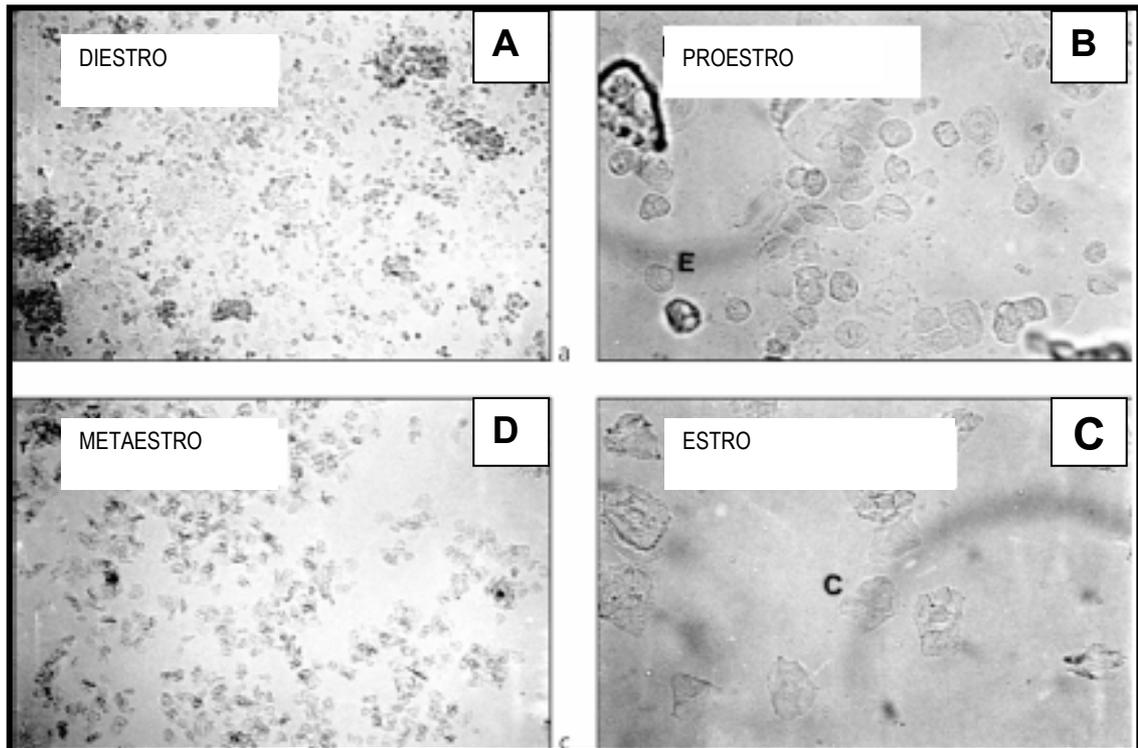


Leitura



NOTA: Após a coleta, o material vaginal coletado foi espalhado na lâmina e analisado. Exame a fresco - aumento de 40x em microscopia ótica.

Fases do Ciclo Estral de Rata



A – Diestro, **B** – Proestro, **C** – Estro, **D** – Metaestro.

NOTA: Determinação do ciclo estral de ratas através dos tipos celulares observados a fresco, em microscopia ótica, aumento de 200x, a partir do esfregaço vaginal.

O ciclo reprodutivo das ratas utilizadas neste estudo, denominado de ciclo estral, pode durar de 4 a 5 dias, sendo constituído de quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (FREEMAN, 1988). Como a citologia vaginal sofre modificações em consequência das variações cíclicas na secreção dos esteróides sexuais, a identificação dos tipos celulares que constituem o epitélio vaginal é utilizada para a identificação das fases do ciclo reprodutivo (HOAR & HICKMAN, 1975).

Durante os 15 dias consecutivos de observação foi possível obter-se três ciclos completos. Os parâmetros avaliados no estudo foram: duração e evolução do ciclo estral, bem como o número de períodos de estro em 15 dias.

7. Análise Estatística

Quando o conjunto de dados, para a comparação dos resultados de três grupos experimentais atendia aos requisitos para a aplicação da estatística paramétrica, utilizou-se a análise de variância paramétrica (ANOVA), seguida do teste a posteriori de Tukey-Kramer. Quando se fez necessária aplicação de estatística não-paramétrica, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foram consideradas significativas as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo programa INSTAT 3.0 (Graphpad Software-1998).

Resultados

1. Determinação da dose de isoflavona com atividade estrogênica

1.1 Teste uterotrófico

A administração de isoflavona nas concentrações avaliadas induziu o crescimento do útero de ratas imaturas expostas, por três dias consecutivos, somente com as doses de 10mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela1. Desenvolvimento corporal de ratas pré-púberes ao longo do tratamento

Desenvolvimento Corporal e do Útero durante o tratamento							
Ratas pré-puberes							
Parâmetros	Grupos						
	Controle (n=7)	Controle Benzoato Estradiol (n=7)	Isoflavona 3,3mg/Kg (n=7)	Isoflavona 10,0mg/K g (n=7)	Isoflavona 33,3mg/K g (n=7)	Isoflavona 100,0mg/ Kg (n=7)	Isoflavona 300,0mg/Kg (n=7)
Peso Corporal Inicial (g)	54,20 ± 1,58 A	56,60 ± 1,81 A	52,71 ± 1,59 A	53,11 ± 1,11 A	53,20 ± 1,34 A	58,36 ± 1,90 A	52,96 ± 1,89 A
Peso Corporal Final (g)	61,86 ± 1,17 A	66,68 ± 2,34 A	59,15 ± 1,79 A	62,16 ± 1,90 A	63,23 ± 2,40 A	69,41 ± 1,91 A	65,92 ± 2,55 A
Peso Úmido Útero (mg)	29,33 ± 1,37 A	79,60 ± 4,81 C	30,81 ± 1,48 A	36,17 ± 0,65 B	31,94 ± 3,33 A	34,59 ± 0,82 B	34,39 ± 3,09 B
Peso Relativo Útero (%)	0,05 ± 0 A	0,12 ± 0,01 C	0,05 ± 0 A	0,07 ± 0 B	0,07 ± 0 A	0,07 ± 0 B	0,07 ± 0 B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 7 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,01$ pelo teste Tukey Kramer.

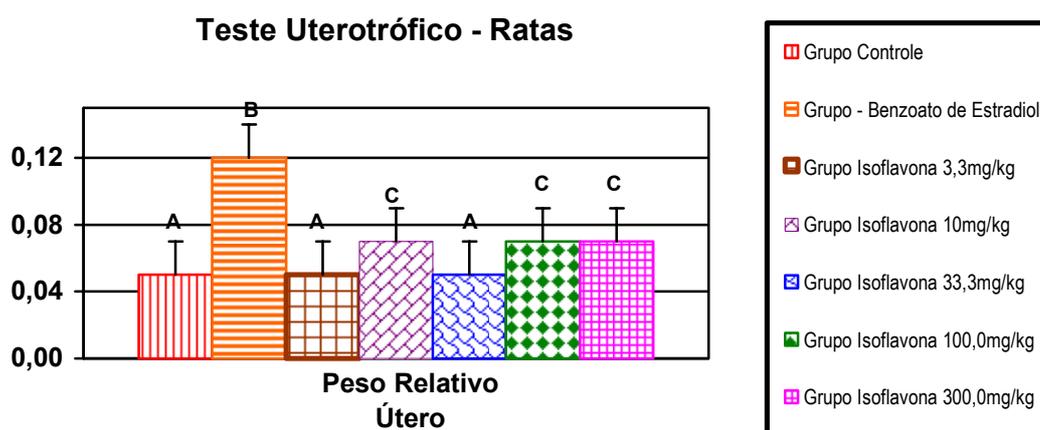


Figura 1. Teste uterotrófico em ratas com 21 dias dos grupos: Controle ($0,05 \pm 0$), Benzoato de Estradiol ($0,12 \pm 0,01$), Isoflavona 3,3mg/Kg ($0,05 \pm 0$), Isoflavona 10mg/Kg ($0,07 \pm 0$), Isoflavona 33,3mg/Kg ($0,07 \pm 0$), Isoflavona 100mg/Kg ($0,07 \pm 0$) e Isoflavona 300mg/Kg ($0,07 \pm 0$). $p < 0,01$ pelo teste Tukey Kramer

1.2. Determinação de atividade estrogênica em camundongos machos

1.2.1. Desenvolvimento de camundongos machos

Os camundongos machos que receberam água enriquecida com 3,3mg de isoflavona/100mL, durante 30 dias, apresentaram ganho de massa corporal significativamente menor, em relação aos camundongos machos que receberam água enriquecida com 100mg de isoflavona/100mL (Tabela 2).

Tabela 2. Ganho de massa corporal (g) de camundongos machos após 30 dias de tratamento com isoflavona.

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=6)	Isoflavona 3,3mg/100mL (n=6)	Isoflavona 100mg/100mL (n=6)
Ganho de Peso corporal (g)	$16,00 \pm 1,37$ A	$12,83 \pm 1,13$ A	$17,70 \pm 1,27$ A,B

Valores expressos em média \pm erro padrão da média de 6 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,05$ pelo teste Tukey-Kramer.

1.2.2. Peso úmido dos testículos, epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal de camundongos machos

Pela análise da Tabela 3 pode-se observar que houve aumento significativo do peso úmido dos testículos dos camundongos machos submetidos à ingestão de água enriquecida com 3,3mg de isoflavona/100mL quando comparados aos grupos Controle e Isoflavona 100mg/100mL. Notou-se também aumento significativo do peso úmido do epidídimo dos camundongos submetidos à ingestão de água enriquecida com 3,3mg e 100mg de Isoflavona/100mL quando comparados ao grupo controle. Todavia, os pesos úmidos do ducto deferente e vesícula seminal, dos animais submetidos à ingestão de água enriquecida com isoflavona, não foram significativamente diferente do grupo Controle (Tabela 3).

Tabela 3. Peso úmido dos Órgãos e Glândulas Sexuais

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=6)	Isoflavona 3,3mg/100mL (n=6)	Isoflavona 100mg/100mL (n=6)
Peso Úmido Testículo (mg)	93,08 ± 5,17 A	106,68 ± 4,80 B	99,25 ± 0,72 A
Peso Úmido Epidídimo (mg)	30,52 ± 1,51 A	36,20 ± 1,15 B	38,15 ± 0,31 B
Peso Úmido Ducto Deferente (mg)	11,97 ± 0,58 A	13,65 ± 1,74 A	11,52 ± 0,67 A
Peso Úmido Ves. Seminal (mg)	36,93 ± 3,44 A	39,83 ± 4,79 A	32,33 ± 2,19 A

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 6 animais/grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,01$ pelo teste Tukey-Kramer.

1.3 Determinação de atividade estrogênica em camundongos fêmeas

1.3.1. Desenvolvimento de camundongos fêmeas

Os camundongos fêmeas que receberam água enriquecida com 3,3mg de isoflavona/100mL, durante 30 dias, apresentaram massa corporal significativamente menor em relação aos camundongos fêmeas que receberam veículo (Tabela 4).

Tabela 4. Ganho de massa corporal (g) de camundongos fêmeas após 30 dias de tratamento com isoflavona.

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=6)	Isoflavona 3,3mg/100mL (n=6)	Isoflavona 100mg/100mL (n=6)
Ganho de Peso corporal (g)	16,77 ± 1,12 A	7,60 ± 1,55 B	13,50 ± 2,40 A,B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 6 animais/grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,01$, pelo teste Tukey-Kramer.

1.3.2 Peso úmido e relativo do útero e ovário de camundongos fêmeas.

Verificou-se aumento significativo dos pesos úmidos absolutos e relativos do útero em camundongos fêmeas submetidos à ingestão de água enriquecida com 100mg de isoflavona/100mL quando comparado aos grupos Isoflavona 3,3mg/100mL e Controle. Todavia, os pesos úmidos absolutos e relativos dos ovários dos camundongos fêmeas submetidos à ingestão de água enriquecida com 3,3mg e 100mg de isoflavona/100mL não foram significativamente diferente do grupo Controle. (Tabela 5).

Tabela 5. Peso úmido e relativo do útero e ovário.

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=6)	Isoflavona 3,3mg/100mL (n=6)	Isoflavona 100mg/100mL (n=6)
Peso Úmido Útero (mg)	82,92 ± 16,15 A	86,48 ± 6,27 A	132,83 ± 3,15 B
Peso Relativo Útero (%)	0,24 ± 0,05 A	0,29 ± 0,01 A	0,38 ± 0,03 B
Peso Úmido Ovário (mg)	15,50 ± 1,98 A	13,92 ± 1,96 A	16,76 ± 1,5 A
Peso Relativo Ovário (%)	0,04 ± 0,01 A	0,04 ± 0,00 A	0,05 ± 0,01 A

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 6 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,05$, pelo teste Tukey-Kramer.

2. Parâmetros maternos determinados a partir do emprego das doses eleitas de Isoflavona, com atividade estrogênica (10mg/Kg e 100mg/Kg)

2.1 Evolução da prenhez

A administração de Isoflavona a ratas prenhes nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg não afetou significativamente o ganho de massa corporal das progenitoras do 6º dia ao 16º dia do período gestacional quando comparado ao grupo controle. No 18º dia notou-se diminuição significativa no ganho de massa corporal das ratas gestantes que receberam isoflavona na dose 100mg/Kg quando comparado com o grupo Isoflavona 10mg/Kg (Tabela 6). Os indicativos de toxicidade materna (diarréia, piloereção, tremores, salivação, convulsões, etc) não foram evidenciados.

Tabela 6. Massa Corporal (g) das Progenitoras durante a Gestação

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=30)	Isoflavona 10 mg/Kg (n=30)	Isoflavona 100 mg/Kg (n=30)
Massa Corporal 1º dia (g)	221,95 ± 5,26 _A	226,01 ± 2,96 _A	225,46 ± 4,60 _A
Massa Corporal 4º dia (g)	229,68 ± 4,62 _A	229,74 ± 3,10 _A	228,86 ± 4,51 _A
Massa Corporal 8º dia (g)	236,93 ± 4,22 _A	238,86 ± 3,01 _A	228,68 ± 3,47 _A
Massa Corporal 12º dia (g)	247,36 ± 3,89 _A	255,69 ± 2,94 _A	242,11 ± 5,12 _A
Massa Corporal 16º dia (g)	255,85 ± 3,85 _A	269,21 ± 3,30 _A	256,04 ± 5,92 _A
Massa Corporal 18º dia (g)	260,37 ± 4,03 _{A,B}	272,70 ± 2,92 _A	253,42 ± 5,66 _B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 30 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,05$, pelo teste Tukey-Kramer.

2.2 Duração da prenhez

A administração de isoflavona, nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg reduziram significativamente a duração da prenhez, quando comparado ao grupo controle (Tabela 7). O nascimento dos filhotes ocorreu por parto normal.

Tabela 7. Duração Gestacional

Tempo Gestacional	Grupos		
	Controle (=10)	Isoflavona 10 mg/Kg (n=10)	Isoflavona 100 mg/Kg (n=10)
Dias	21,30 ± 0,15 A	19,50 ± 0,16 B	20,40 ± 0,16 B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 10 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,01$, pelo Tukey-Kramer.

2.3. Laparotomia exploratória (parâmetros gestacionais)

As ratas prenhes expostas à isoflavona na dose de 100mg/Kg, após laparotomia exploratória, apresentaram menor número de corpos lúteos quando comparadas às ratas expostas à isoflavona na dose de 10mg/Kg e às ratas expostas ao veículo. As ratas prenhes expostas à isoflavona nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg apresentaram menor número de fetos vivos quando comparadas ao grupo controle. O número de fetos em lise apresentou-se maior em ratas expostas à isoflavona na dose de 100mg/Kg quando comparadas aos demais grupos. As ratas prenhes expostas a esta dose também apresentaram maior número de sítios de reabsorção e menor número de sítios implantados quando comparadas às ratas que receberam isoflavona na dose de 10mg/Kg e às ratas expostas ao veículo (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros Gestacionais

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=20)	Isoflavona 10mg/Kg (n=20)	Isoflavona 100mg/Kg (n=20)
Corpos Lúteos	10,35 ± 0,15 A	10,10 ± 0,12 A	9,60 ± 0,29 B
Fetos Vivos	10,00 ± 0,13 A	7,70 ± 0,48 B	5,25 ± 1,05 B
Fetos Lise	0,05 ± 0,05 A	1,85 ± 0,46 B	3,15 ± 0,88 C
Sítios Reabs.	0,35 ± 0,15 A	0,25 ± 0,12 A	0,45 ± 0,23 B
Sítios Implant.	10,00 ± 0,12 A	7,00 ± 0,71 A,B	4,80 ± 1,16 B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 20 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,05$, pelo teste Tukey-Kramer.

2.4 Perdas pré- e pós-implantação em ratas

As ratas submetidas ao tratamento com isoflavona nas doses 10mg/Kg e 100mg/Kg apresentaram taxas de perdas pré-implantação, significativamente maiores quando comparado ao grupo Controle. O grupo Isoflavona 100mg/Kg apresentou também maior taxa de perda pré-implantação quando comparado ao grupo Isoflavona 10mg/Kg. Quanto às perdas pós-implantação observou-se aumento significativo no grupo 100mg/Kg em relação aos grupos Controle e Isoflavona 10mg/Kg (Tabela 9).

Tabela 9. Taxas de Perdas Pré- e Pós-Implantação (%)

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=20)	Isoflavona 10mg/Kg (n=20)	Isoflavona 100mg/Kg (n=20)
Pré-implant.	3,24 ± 1,02 A	30,84 ± 7,0 B	54,41 ± 10,98 C
Pós-implant.	0,00 ± 0,00 A	0,00 ± 0,00 A	2,45 ± 0,97 B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 20 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,05$, Kruskal Wallis – Dunn.

3. Avaliação dos descendentes machos e fêmeas

As ratas pertencentes ao grupo Controle (10/grupo) pariram um total de 102 filhotes, sendo 52 machos e 50 fêmeas, enquanto aquelas do grupo Isoflavona 10 mg/Kg (10/grupo) pariram um total de 57 filhotes, sendo 28 machos e 29 fêmeas e as do grupo Isoflavona 100mg/Kg (10/grupo) pariram um total de 51 filhotes, sendo 25 machos e 26 fêmeas. Durante a lactação e após o desmame, não ocorreu óbito de filhotes. Observa-se que as ratas do grupo Controle pariram número de filhotes/ninhada significativamente maior quando comparadas aos grupos Isoflavona 10mg/Kg e 100mg/Kg, $p < 0,001$, teste Tukey - Kramer.

Em relação aos dados da razão sexo não houve diferença significativa entre os grupos, $p > 0,05$ (ANOVA).

3.1. Parâmetros determinados em machos

3.1.1. Peso corporal pós-natal

No primeiro dia de vida pós-natal os filhotes machos do grupo Isoflavona 10mg/Kg apresentaram peso corporal significativamente maior, quando comparado aos grupos Controle e Isoflavona 100mg/Kg. Neste mesmo período

os filhotes machos do grupo Isoflavona 100mg/Kg apresentaram menor peso corporal inicial, com diferença significativa, quando comparados aos grupos Controle e Isoflavona 10mg/Kg. Aos 7 dias de vida pós-natal, os filhotes machos cujas mães receberam isoflavona, na dose de 10mg/Kg apresentaram massa corporal significativamente maior quando comparados aos grupos Controle e 100mg/Kg, enquanto os grupos que receberam isoflavona na dose de 100mg/Kg não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Controle. Nos 14° e 21° dia pós-natal observou-se menor ganho na massa corporal dos ratos pertencentes aos grupos 10mg/Kg e 100mg/Kg comparados ao grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10. Desenvolvimento corporal pós-natal (peso em g) dos filhotes machos, do nascimento ao 21° dia de vida

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=20)	Isoflavona 10mg/Kg (n=20)	Isoflavona 100mg/Kg (n=20)
1° dia pós natal (g)	6,74 ± 0,15 A	7,84 ± 0,10 B	6,33 ± 0,09 C
7° dia pós natal (g)	11,80 ± 0,43 A	14,47 ± 0,31 B	11,50 ± 0,07 A
14° dia pós natal (g)	24,89 ± 0,45 A	20,39 ± 0,35 B	20,06 ± 0,14 B
21° dia pós natal (g)	60,03 ± 1,19 A	37,00 ± 0,50 B	38,90 ± 0,73 B

Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=20 animais/grupo).

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,05$, pelo teste Tukey Kramer.

3.1.2. Idade por ocasião do surgimento de pêlos, abertura dos olhos, descolamento de orelhas, descida testicular e separação prepucial

Os filhotes machos submetidos à Isoflavona 10mg/Kg apresentaram surgimento de pêlos mais precoce quando comparados aos grupos Isoflavona 100 mg/Kg e Controle. Os tempos médios para abertura dos olhos mostraram-se maiores para os filhotes machos que receberam isoflavona nas doses 10mg/Kg e 100mg/Kg, comparados ao grupo Controle. O descolamento das orelhas e a descida testicular apresentaram menor tempo médio aos filhotes expostos a isoflavona nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg comparados ao controle. Os filhotes machos que receberam isoflavona na dose 10mg/Kg apresentaram menor tempo médio na separação prepucial quando comparados aos grupos Isoflavona 100 mg/Kg e Controle (Tabela 11).

Tabela 11. Idade (dias) por ocasião do surgimento de pêlos, abertura dos olhos, descolamento de orelhas, descida testicular e separação prepucial

Parâmetros (dias)	Grupos		
	Controle (n=20)	Isoflavona 10mg/Kg (n=20)	Isoflavona 100mg/Kg (n=20)
Surgimento Pêlos	8,30 ± 0,16 A	7,35 ± 0,11 B	8,20 ± 0,09 A
Abertura Olhos	14,20 ± 0,15 A	14,45 ± 0,11 B	15,10 ± 0,07 B
Descolamento Orelhas	8,70 ± 0,10 A	7,40 ± 0,11 B	7,65 ± 0,11 B,C
Descida Testicular	20,20 ± 0,44 A	17,75 ± 0,16 B	18,40 ± 0,15 B
Separação Prepucial	37,50 ± 0,11 A	36,60 ± 0,15 B	37,00 ± 0,16 A,B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 20 animais/grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,01$, teste Kruskal Wallis - Dunn.

3.2. Parâmetros determinados em fêmeas

3.2.1. Peso corporal

No primeiro dia de vida pós-natal, os filhotes fêmeas do grupo Controle apresentaram massa corporal significativamente menor quando comparados aos filhotes dos grupos Isoflavona 10mg/Kg e 100mg/Kg. Aos 7 dias de idade os 3 grupos experimentais apresentaram massas corporais semelhantes. Aos 14 dias de vida pós-natal, os filhotes fêmeas do grupo Isoflavona 100mg/Kg apresentaram significativamente, menor ganho de massa corporal quando comparados ao grupo Controle. No 21º dia de vida pós-natal, os filhotes fêmeas do grupo 100mg/Kg, apresentaram significativamente, menor ganho de massa corporal, quando comparados aos grupos Controle e Isoflavona 10mg/Kg. Os filhotes fêmeas do grupo Isoflavona 10mg/Kg também apresentaram significativamente, menor ganho de massa corporal quando comparados ao grupo Controle (Tabela 12).

Tabela 12. Desenvolvimento corporal pós-natal (peso em g) dos filhotes fêmeas, do nascimento ao 21º dia de vida

Parâmetros	Grupos		
	Controle (n=27)	Isoflavona 10mg/Kg (n=22)	Isoflavona 100mg/Kg (n=29)
1º dia pós natal (g)	6,77 ± 0,11 A	7,48 ± 0,08 B	7,18 ± 0,07 A,B
7º dia pós natal (g)	11,44 ± 0,26 A	11,19 ± 0,25 A	11,77 ± 0,37 A
14º dia pós natal (g)	21,96 ± 0,44 A	20,77 ± 0,34 A,B	19,55 ± 0,45 B
21º dia pós natal (g)	42,57 ± 1,05 A	37,31 ± 0,30 B	33,43 ± 0,94 C

Valores expressos em média ± erro padrão da média.

Os números entre parênteses indicam a quantidade de animais avaliados em cada grupo.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,05$, pelo teste Tukey-Kramer.

3.2.2. Idade (dias) por ocasião do surgimento de pêlos, abertura dos olhos, descolamento de orelhas e abertura do canal vaginal

Os filhotes fêmeas do grupo Isoflavona 100mg/Kg apresentaram o surgimento de pêlos significativamente mais precoce, quando comparados ao grupo Controle. Os tempos médios para abertura dos olhos mostraram-se significativamente maiores para os filhotes fêmeas do grupo Isoflavona 10mg/Kg e 100mg/Kg quando comparados ao grupo Controle. Os tempos médios para o descolamento das orelhas apresentaram-se significativamente menores para os filhotes fêmeas dos grupos Isoflavona 10mg/Kg e 100mg/Kg quando comparados ao grupo Controle. Os filhotes fêmeas do grupo Isoflavona 10mg/Kg apresentaram tempo médio na abertura do

canal vaginal significativamente menor quando comparados ao grupo Controle (Tabela 13).

Tabela 13. Idade por ocasião do surgimento de pêlos, abertura dos olhos, descolamento de orelhas, abertura vaginal

Parâmetros (dias)	Grupos		
	Controle (n=27)	Isoflavona 10mg/Kg (n=22)	Isoflavona 100mg/Kg (n=29)
Surgimento Pêlos	8,29 ± 0,11 A	8,00 ± 0,20 A,B	7,68 ± 0,19 B
Abertura Olhos	14,29 ± 0,13 A	15,50 ± 0,17 B	15,55 ± 0,15 B
Descolamento Orelhas	8,55 ± 0,09 A	7,59 ± 0,12 B	7,58 ± 0,13 B
Abertura Vaginal	38,29 ± 0,13 A	37,59 ± 0,14 B	37,93 ± 0,16 A,B

Valores expressos em média ± erro padrão da média.

Os números entre parênteses representam o número de filhotes fêmeas avaliados em cada grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,01$, pelo teste Kruskal Wallis - Dunn.

3.2.3. Ciclo estral

Na tabela 14 encontram-se os dados referentes à avaliação do ciclo estral acompanhado por 15 dias consecutivos de ratas dos grupos Controle, Isoflavona 10mg/Kg e Isoflavona 100mg/Kg. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de estros observados neste período, porém houve um aumento significativo em sua duração (em 3 ciclos completos) nas ratas do grupo Isoflavona 10mg/Kg quando comparadas às ratas do grupo Controle.

Tabela 14. Avaliação do ciclo estral de ratas dos grupos Controle, Isoflavona 10mg/Kg, Isoflavona 100mg/Kg.

	Grupos		
	Controle	Isoflavona 10mg/Kg	Isoflavona 100mg/Kg
Número de estros/15 dias	3,53 ± 0,13 A	3,33 ± 0,15 A	3,40 ± 0,21 A
Duração do estro (h) @	24,40 ± 0,40 A	26,80 ± 0,93 B	25,33 ± 0,72 A,B

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 15 animais/grupo.

@ média de duração do estro, em horas, em 3 ciclos consecutivos.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os valores na horizontal, $p < 0,01$, pelo teste Tukey-Kramer.

Discussão

Com o aumento da expectativa de vida das mulheres e, ao mesmo tempo, com o crescimento dos fatores que agravam doenças crônicas, como fumo, estresse, vida sedentária e hábito alimentar rico em gordura entre outros, a terapia de reposição hormonal nas mulheres na pós-menopausa tem sido cada vez mais indicada. A isoflavona poderia ser uma alternativa terapêutica neste período de vida da mulher. Considerando que a soja e seus derivados (ricos em isoflavona) vêm sendo aos poucos utilizados na dieta de parte da população, onde todos os integrantes da família adotam igualmente a dieta, pouco se sabe sobre a implicação deste procedimento. A soja contém altas concentrações de isoflavona, particularmente de genisteína que apresenta afinidade com ambos receptores alfa e beta (WUTTKE, 2006). O consumo diário de 45 a 100mg de isoflavona, que equivale a 60-100g de soja, seria suficiente para se obter benefícios (BAIRD *et al.*, 1995; FUKUTAKE *et al.*, 1996). Assim, diferentes estudos devem ser conduzidos para caracterizar uma possível toxicidade reprodutiva deste produto.

No teste uterotrófico efetuado no presente estudo observou-se que a administração de diferentes doses de isoflavona foi capaz de aumentar o peso úmido do útero de ratas imaturas, com diferentes doses. A partir destes resultados, foram eleitas às doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg como doses com atividade estrogênica, as quais foram testadas nos demais parâmetros do estudo. Vale ressaltar que no extrato concentrado de soja, a genisteína e a daidzeína são referidas como as isoflavonas que apresentam maior ação estrogênica no útero de ratas. Estudos experimentais em ratas mostraram que doses de genisteína, entre 50 e 100mg/Kg ao dia, são efetivas para estimular o crescimento dos cornos uterinos e trofismo da citologia vaginal (SANTELL *et al.*, 1997). Porém, a administração da isoflavona na dose 150mg resultou no desenvolvimento de hiperplasia endometrial (WUTTKE, 2006). Dos componentes das isoflavonas que correspondem à mistura de substâncias que têm diferentes afinidades pelos receptores de estrogênio, a genisteína apresenta maior atividade estrogênica (PIOVESAN *et al.*, 2004). Foram relatadas anteriormente propriedades

estrogênicas e antiestrogênicas dos fitoestrogênios que decorrem da sua interação com os receptores de estrogênios (SETCHELL *et al.*, 1987; KONDO *et al.*, 1990). Alguns trabalhos têm demonstrado também uma maior sensibilidade para o efeito uterotrófico em ratas imaturas, em relação às ovariectomizadas (ASHBY *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 2000). Deve ser ressaltado que o composto de isoflavonas tem, além da genisteína, outras substâncias que por terem semelhança estrutural e funcional com os estrogênios, poderiam modular o receptor de estrogênio (PIKE *et al.*, 1991; MORITO *et al.*, 2001). Acredita-se que a ação estimulatória das isoflavonas deve-se à sua ação no receptor de estrogênio, principalmente pela ativação do receptor beta (TOTTA *et al.*, 2005). Apesar da atividade estrogênica em geral (WHITTEN *et al.*, 1994; PATISAUL *et al.*, 1998; WHITTEN e PATISAUL, 2001) e as ações uterotróficas específicas da isoflavona da soja (SONG *et al.*, 1999; DIEL *et al.*, 2000) estarem bem estabelecidas, os efeitos das dietas de isoflavonas nas ações uterotróficas de estrógenos exógenos não estão totalmente claros. Diversos estudos, em ratos, procuraram determinar uma interação significativa entre a dieta de isoflavona e os agonistas estrogênicos na indução à resposta uterotrófica (WHITTEN *et al.*, 1994; SANTELL *et al.*, 1997), mas nenhum efeito foi encontrado (TANSEY *et al.*, 1998). Todavia, os dados do presente estudo mostraram que a administração de isoflavona pode induzir à resposta uterotrófica. Por outro lado, observou-se resposta positiva com doses de 50 e 100mg/Kg por dia de genisteína, apesar de não se detectar aumento da expressão do c-fos, um dos marcadores da atividade estrogênica. Contudo, no útero de ratas (DA/Han) castradas foi relatada expressão aumentada desse marcador (c-fos) com a dose de 100mg/Kg por dia (DIEL *et al.*, 2001). Makela *et al.* (1999) reportaram ausência de atividade uterotrófica da genisteína quando sua concentração foi inferior a 2,5mg/Kg por dia na alimentação de ratas castradas. Já Ishimi *et al.* (2000) observaram em camundongos fêmeas, que doses maiores que 5mg/Kg por dia foram necessárias para se obter efeitos uterotróficos. A isoflavona, na dose de 100mg/Kg foi suficiente para aumentar significativamente o peso do útero em ratas castradas

(MOSQUETE, 2004), dados estes semelhantes àqueles obtidos com as ratas pré-púberes do presente estudo. Outro estudo mostrou também que, com dose de 300mg/Kg por dia, houve alteração significativa no peso uterino e modificações morfológicas e morfométricas no miométrio de ratas (MOSQUETTE, 2006). Todavia, no presente estudo, com a dose de 300mg/Kg obtivemos respostas positivas, porém estas foram menores que aquelas obtidas com as doses de 10mg/Kg e de 100mg/Kg. Provavelmente, por termos utilizado uma substância natural composta por uma mistura de componentes, não tenhamos observado a relação dose-efeito encontrada com substâncias puras. Com a dose de 300mg/Kg provavelmente tenhamos exposto, então, os animais a quantidades maiores de outros princípios ativos que poderiam agora prejudicar, ou mesmo comprometer a atividade estrogênica em estudo. Os dados da literatura corroboram assim com as doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg eleitas no presente estudo.

Sabe-se que a saúde do útero e dos ovários é fundamental para o adequado funcionamento do sistema reprodutivo feminino, o qual pode ser avaliado pela medida de suas massas. As alterações hormonais durante o ciclo sexual feminino refletem em variações na massa uterina onde, em resposta ao estrógeno, o útero é distendido e enche-se de fluido (U.S. EPA, 1996). Sendo assim, a massa uterina pode ser utilizada em testes que busquem avaliar o potencial estrogênico de diferentes agentes. Para os ovários, alteração na massa pode estar associada à depleção de folículos, presença de cistos, inibição da formação do corpo lúteo ou alteração na função do hipotálamo ou hipófise (U.S. EPA, 1996). A massa dos órgãos pode ser apresentada como dado absoluto ou em relação à massa corporal, uma vez que a redução na massa do órgão pode ou não estar relacionada com um prejuízo no desenvolvimento ponderal do animal. No presente estudo, a exposição de camundongos fêmeas a água enriquecida com 100mg de isoflavona/100mL proporcionou aumento do peso úmido do útero quando comparada aos grupos que receberam água enriquecida com 3,3mg de Isoflavona/100mL e Controle, tendo sido possível identificar neste modelo o

potencial estrogênico de 100mg de isoflavona solubilizado em 100mL de água. Adicionalmente, os camundongos fêmeas expostos a água enriquecida com 3,3mg e 100mg de isoflavona/100mL, não apresentaram alteração no peso úmido dos ovários quando comparados ao grupo Controle. Testes adicionais, como receptividade sexual e capacidade de engravidar, seriam necessários para caracterizar o impacto da isoflavona nas doses estudadas, sobre a fertilidade futura.

Efeitos sobre as variáveis reprodutivas independentes de alterações na massa corporal são suficientes para identificar um agente como potencialmente capaz de oferecer risco ao sistema reprodutivo (ZENICK e CLEGG, 1989) em ambos os sexos. No presente estudo, a ingestão de água enriquecida com 3,3mg isoflavona/100mL, durante 30 dias proporcionou aos camundongos machos um menor ganho da massa corporal, quando comparados aos camundongos controle que receberam veículo e aos camundongos que receberam água enriquecida com 100mg de isoflavona/100mL. Em relação aos camundongos fêmeas observou-se que aqueles que receberam água enriquecida com 3,3mg de isoflavona/100mL, durante 30 dias apresentaram também apresentaram um menor ganho na massa corporal quando comparados com aqueles que receberam apenas o veículo. Por outro lado, Mosquette (2006) não obteve diferença significativa entre os pesos corporais utilizando aqui, ratas tratadas com isoflavonas nas doses de 10mg/Kg e 300mg/Kg, em comparação àquelas tratadas com estrogênios na dose 200mg/Kg.

Em geral os efeitos adversos observados nos animais de laboratório, quando expostos a uma substância química podem ocorrer também em seres humanos, conferindo aos estudos com animais de laboratório importante fonte de dados toxicológicos (LU, 1991b; DOURSON, 2002). Roedores e coelhos são os animais mais adequados para estudos de toxicologia reprodutiva (AMANN, 1982). Assim, alterações na massa absoluta ou relativa de órgãos reprodutivos provêm claras evidências para classificar um agente como sendo potencialmente prejudicial ao sistema reprodutivo (ZENICK e CLEGG, 1989). No presente

estudo, foi possível verificar o aumento significativo do peso úmido do epidídimo dos camundongos submetidos à água enriquecida com de 3,3mg e 100mg de isoflavona/100mL quando comparado ao grupo Controle. Observou-se também que houve aumento significativo do peso úmido dos testículos dos camundongos machos submetidos à ingestão de água enriquecida com 3,3mg de isoflavona/100mL quando comparados aos grupos Controle e Isoflavona 100mg/100mL. No entanto, os pesos úmidos do ducto deferente e da vesícula seminal, dos animais submetidos à ingestão de isoflavona não foram diferentes do grupo Controle. A massa dos testículos apresenta pouca variação entre animais da mesma espécie, sendo, portanto um marcador sensível de injúria gonadal (U.S. EPA, 1996). As massas das glândulas sexuais acessórias, andrógeno-dependentes podem refletir alguma interferência no sistema endócrino e na função testicular (U.S. EPA, 1996). Sabe-se que durante o desenvolvimento pré- e perinatal, a exposição a hormônios androgênicos é essencial para que essas glândulas exibam uma responsividade adequada na idade adulta (MABLY *et al.*, 1992; LOEFFLER e PETERSON, 1999). Substâncias que interfiram na ação hormonal podem afetar a diferenciação sexual masculina resultando em alterações estruturais e funcionais das glândulas sexuais e acessórias (LOEFFLER e PETERSON, 1999; OTSBY *et al.*, 1999). Os dados obtidos com os camundongos machos expostos a água enriquecida com isoflavona no período pré-púbere, mostrando maior desenvolvimento dos testículos e epidídimo, não indicaram sinais de toxicidade. Todavia, estudo mais detalhado merece ser realizado no sentido de explicar se o maior desenvolvimento destes órgãos trará realmente alguma vantagem na vida adulta destes animais.

No presente estudo, a laparotomia exploratória das ratas prenhes tratadas com isoflavona nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg mostrou redução significativa no número de fetos vivos. As ratas prenhes que receberam isoflavona na dose de 100mg/Kg apresentaram também um maior número de fetos em lise e de sítios de reabsorção. Apesar da indicação de inexistência de

toxicidade materna, estes parâmetros observados na laparotomia exploratória mostram uma injúria reprodutiva induzida pela isoflavona, provavelmente por uma potencial ação embriofetotóxica.

Variação no tempo da gestação pode também indicar um efeito da droga no processo de gestação ou parto. Assim, era de se esperar uma redução no peso dos filhotes das ratas tratadas com isoflavona nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg, uma vez que elas anteciparam o dia do parto. Todavia, os filhotes machos apresentaram maior massa corporal ao nascer somente no grupo Isoflavona 10mg/Kg, enquanto os filhotes fêmeas apresentaram aumento com as doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg. Portanto, a massa corporal do filhote ao nascer foi influenciada não só pela duração da prenhez mas também, provavelmente, pelo crescimento intra-uterino influenciado pelo tratamento da gestante com a isoflavona. Estes resultados indicam que o desenvolvimento dos filhotes *in útero* parece ter sido favorecido pelo emprego da isoflavona. Notou-se também neste estudo, que as ratas prenhes que receberam isoflavona nas doses 10mg/Kg e 100mg/Kg apresentaram ninhadas com número reduzido de filhotes quando comparadas as ratas do grupo Controle. Sabe-se que ninhadas com grande número de filhotes, em geral apresentam descendentes de menor massa em relação àqueles provenientes de ninhadas com poucos filhotes. O tamanho da ninhada é então influenciado pelo número de ovócitos viáveis para a fertilização, pelas taxas de fertilização e implantação e pela proporção de embriões implantados que sobrevivem até o parto. O aumento na massa corporal dos filhotes fêmeas cujas mães receberam isoflavona provavelmente não tenha sido devido ao menor número de filhotes/ninhada. Se assim o fosse, teria ocorrido aumento na massa dos filhotes machos ou não teria ocorrido redução na massa do grupo tratado que teve o parto antecipado, uma vez que ocorreu menor número de filhotes viáveis por ninhada. Agentes capazes de interferir no desenvolvimento sexual podem afetar também as características sexuais externas dos filhotes alterando a proporção entre machos e fêmeas da ninhada. A

administração de isoflavona nas doses estudadas não alterou a proporção entre machos e fêmeas das ninhadas dos diferentes grupos.

A mortalidade materna é também um sinal de toxicidade. No entanto, outras variáveis podem ser indicativas de efeitos adversos mais sutis, como a massa corporal durante o tratamento e alterações nos parâmetros da prenhez (U.S. EPA, 1991; U.S. EPA, 1996). A administração de isoflavona a ratas prenhes nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg não afetou o ganho de massa corporal das progenitoras do 6º dia ao 16º dia do período gestacional quando comparado ao grupo Controle. No 18º dia notou-se diminuição no ganho de massa corporal das ratas gestantes que receberam isoflavona na dose 100mg/Kg quando comparado com o grupo Isoflavona 10mg/Kg, porém não levou a mortalidade materna. Desta forma, estudos adicionais são necessários para determinar se a utilização da isoflavona, em dose incapaz de levar à toxicidade materna seria capaz de induzir malformações externas, viscerais ou esqueléticas nos conceptos. Vale a pena ressaltar que agentes que induzem toxicidade de desenvolvimento, sem produzir toxicidade materna, geram preocupação não apenas pelo potencial tóxico mas sim pela possibilidade de interferir tardiamente no desenvolvimento do indivíduo, a exemplo do que acontece com os desreguladores endócrinos (PEREIRA, 2003). Além disso, independente da origem dos efeitos adversos nos descendentes, esses efeitos se presentes na progenitora podem ser reversíveis, enquanto que nos filhotes podem ser permanentes ou detectáveis somente na vida adulta reprodutiva.

Parâmetros recomendados para avaliar a interferência endócrina de substâncias químicas sobre o desenvolvimento sexual compreendem a descida dos testículos e os biomarcadores de início da puberdade que, em ratos, são medidos pelos tempos médios (dias) para a separação prepucial e para a abertura do canal vaginal (U.S. EPA, 1996). Através do presente estudo pode-se observar que os filhotes machos cujas mães receberam isoflavona nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg apresentaram antecipação na descida testicular quando comparados

aos demais grupos. Os filhotes machos que receberam isoflavona na dose 10mg/Kg apresentaram menor tempo médio na separação prepucial quando comparados aos grupos Isoflavona 100 mg/Kg e Controle. A descida dos testículos ao escroto e a separação prepucial constituem sinais externos indicativos do desenvolvimento sexual masculino e dependem da secreção de andrógenos (DALSENTER *et al.*, 1999). Provavelmente a isoflavona tenha facilitado uma ação androgênica nos animais do presente estudo, antecipando a descida testicular e a instalação da puberdade através de uma retroalimentação positiva no sistema de liberação de gonadotrofinas, a exemplo do que ocorre em determinada fase do ciclo estral/menstrual da fêmea. Dados conflitantes com aqueles que indicam uma antecipação na instalação da puberdade com o emprego da isoflavona tem sido descritos, associando-se o estrógeno ou substâncias estrogênicas com falha na descida dos testículos ao escroto (HADZISELMOVIC *et al.*, 2000; McLACHLAN *et al.*, 2001; COVENEY *et al.*, 2002). Num estudo conduzido com metoxiclor - um pesticida organoclorado - e genisteína, observou-se que quando administrados separadamente, apenas o pesticida foi capaz de atrasar a separação prepucial em ratos expostos durante a gestação, lactação e após o desmame. No entanto, quando administrados concomitantemente, a genisteína aumentou o efeito do metoxiclor em retardar a separação prepucial. Nas fêmeas estes compostos aceleraram a abertura do canal vaginal, tanto isolados quanto coadministrados, com aparente efeito cumulativo sobre essa variável (YOU *et al.*, 2002).

Os filhotes fêmeas do grupo Isoflavona 10mg/Kg também apresentaram antecipação na abertura vaginal quando comparados aos filhotes fêmeas do grupo Controle, demonstrando a atividade estrogênica da isoflavona neste parâmetro. A abertura do canal vaginal, um indicador não invasivo de desenvolvimento sexual feminino depende da secreção de estrógeno. Portanto, pode ocorrer abertura precoce do canal vaginal com compostos que apresentem atividade estrogênica (MARTY *et al.*, 1999). Ratas expostas ao estradiol durante a vida perinatal

revelaram início da puberdade adiantado (PEREIRA *et al.*, 1997). As isoflavonas e seus conjugados, genisteína, daidzeína e gliciteína, são absorvidos rapidamente em dietas de roedores (KING, 1998; CHANG *et al.*, 2000; DEGEN *et al.*, 2002) e mostram também atividade em testes *in vivo* e *in vitro* (FARMAKALIDIS e MURPHY, 1984; FARMAKALIDIS *et al.*, 1985; MARKIEWICZ *et al.*, 1993; SONG *et al.*, 1999). Assim, a exposição a estes agentes pode atuar, a longo prazo, no desenvolvimento reprodutivo e funcional de ratos (BOETTGER *et al.*, 1998; ASHBY *et al.*, 2000b; BROWN e SETCHELL, 2001; ODUM *et al.*, 2001). Portanto, compostos que desestabilizem o equilíbrio hormonal podem interferir no processo de instalação da puberdade, acelerando-o ou retardando-o.

Analisando alterações causadas pela administração de isoflavona no que se refere ao desenvolvimento ponderal dos animais, num contexto toxicológico, devemos buscar confrontar a variação na massa corporal e o sistema reprodutivo. Nas fêmeas é importante considerar que a massa corporal pode flutuar normalmente com o estado fisiológico do animal, uma vez que o estrógeno e progesterona influenciam na ingestão alimentar e no consumo energético. Afetam também a retenção de líquido e a deposição de gordura. No estudo aqui apresentado, as ratas descendentes das mães submetidas ao tratamento com isoflavona na dose 100mg/Kg, apresentaram menor ganho de massa corporal no 14º dia de vida pós-natal quando comparadas às do grupo Controle. Filhotes fêmeas do grupo Isoflavona 100mg/Kg apresentaram menor ganho de massa corporal no 21º de vida pós-natal, quando comparados aos filhotes do grupo Controle e 10mg/Kg. Provavelmente a isoflavona administrada durante o período gestacional tenha comprometido a quantidade e/ou qualidade do leite das primeiras mamadas, bem como ter influenciado o sistema metabólico das descendentes.

Como já foi discutido anteriormente, alterações no sistema reprodutivo podem ser secundárias à ocorrência de toxicidade não reprodutiva (ZENICK e CLEGG, 1989; U.S. EPA, 1996). No presente estudo, com o emprego da

isoflavona nas doses de 10 mg/Kg e 100mg/Kg, através da observação do desenvolvimento ponderal e do monitoramento diário dos filhotes machos e fêmeas, até a instalação da puberdade, observamos ausência de convulsões, tremores e piloereção, bem como salivação inalterada. Estes dados são indicativos de ausência de sinal de toxicidade. Simultaneamente observou-se adiantamento no surgimento de pêlos, abertura dos olhos e descolamento das orelhas. Apesar disto, os filhotes machos cujas mães receberam isoflavona na dose 10mg/Kg, durante a gestação, apresentaram maior massa corporal no 7º dia de vida pós-natal comparados aos grupos Controle e Isoflavona 100mg/Kg. Nos períodos, 14º e 21º dia pós-natal ocorreu menor ganho de massa corporal nos filhotes machos pertencentes às mães que receberam isoflavona nas doses grupos 10mg/Kg e 100 mg/Kg comparados aos filhotes do grupo Controle. O declínio na massa corporal ou redução do ganho de massa pode então ser reflexo de toxicidade sistêmica (ZENICK e CLEGG, 1989; U.S. EPA, 1996). A isoflavona, apesar da aparente facilitação no aparecimento de alguns parâmetros do desenvolvimento, mostrou pelo menor ganho corporal dos animais tratados, uma possível toxicidade que deve ser considerada.

Além da abertura do canal vaginal e do desenvolvimento da massa do útero, outras medidas para avaliação da atividade estrogênica são recomendadas. Dentre elas encontramos a presença de células cornificadas da vagina, indicativa da fase de estro. A indução de estro persistente pelo dietilestilbestrol (DES) em ratas ovariectomizadas, ainda hoje é uma das mais utilizadas na triagem de estrogenicidade *in vivo* (EDSTAC, 1998). Até a presente data, poucos são os estudos referentes à ação da isoflavona sobre o ciclo estral de ratas. No presente estudo, ratas adultas, expostas “*in útero*” à isoflavona nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg não apresentaram alteração notável no número de estros observados em 15 dias consecutivos do ciclo estral. Apesar disto, houve um aumento significativo na duração do estro nas ratas do grupo Isoflavona 10mg/Kg. A alteração do ciclo estral com prolongamento do estro pode ser uma resposta à

exposição a um agente com propriedade estrogênica ou um agente capaz de bloquear ovulação (U.S. EPA, 1996). Todavia, a normalidade do ciclo estral apesar de ser um indicativo do bom funcionamento do sistema neuroendócrino reprodutivo e dos ovários, não caracteriza o efeito de uma substância sobre a fertilidade feminina. Um ciclo vaginal regular não indica necessariamente que a ovulação ocorreu. Com agentes antiinflamatórios, por exemplo, pode haver formação de tecido lúteo em folículos ovarianos que não se rompem o que reflete na redução da fertilidade. Por outro lado, substâncias podem induzir alterações no ciclo estral em doses que não comprometem a fertilidade (U.S. EPA, 1996).

Finalizando, com base nos resultados obtidos no presente estudo, com o emprego de um derivado da soja - isoflavona - em diferentes modelos experimentais, pode-se observar que as doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg apresentam atividade estrogênica em ratas. Em adição, apesar da recomendação indiscriminada do uso da soja e seus derivados, os resultados deste estudo mostraram também que esta conduta não é totalmente isenta de efeitos indesejáveis. Cautela deve ser tomada até que estudos mais extensos sejam realizados, avaliando os possíveis efeitos tardios do consumo da soja e seus derivados, em especial a isoflavona em períodos críticos do desenvolvimento bem como sua participação e/ou implicação no sexo masculino.

Conclusões

- A isoflavona em ratas e camundongos fêmeas pré-púberes foi capaz de induzir o crescimento do útero. A presença de efeito da isoflavona para as variáveis responsivas ao estrógeno, avaliadas neste estudo, indica que este produto natural pode ativar receptores estrogênicos *in vivo*, mostrando-se viável em órgãos-alvo como o útero.
- A água enriquecida com isoflavona levou a menor ganho de massa corporal em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. Apesar disto, os camundongos machos pré-púberes, expostos a água enriquecida com isoflavona apresentaram aumento do peso úmido dos testículos e epidídimos. Isto demonstra possíveis efeitos sobre o sistema reprodutor, podendo resultar em interferência na regulação endócrina, e devem ser alvo de estudos posteriores.
- Ratas prenhes tratadas com isoflavona durante o período gestacional apresentaram, no final da gestação alterações na massa corporal, no entanto houve ausência de alterações em parâmetros gestacionais, indicando ausência de toxicidade materna. Todavia, houve uma notável redução na duração da prenhez, que resultou em evolução para parto normal.
- A análise dos fetos obtidos através de laparotomia exploratória, ao final da gestação, revelou que este produto natural pode resultar em efeitos não demonstrados na literatura, como a embriofetotoxicidade.
- A exposição pré-natal à isoflavona acelerou a instalação da puberdade em ratos machos e fêmeas e aumentou a duração da fase de estro ao longo de 3 ciclos estrais consecutivos.
- Os dados obtidos no presente estudo por certo trarão uma contribuição à literatura específica, uma vez que pouco se sabe sobre o efeito da isoflavona no período perinatal e ao longo do desenvolvimento, até a puberdade. Torna-se então imperativa a utilização de protocolos validados por agências regulatórias e comunidades científicas para melhor avaliar os possíveis riscos que este produto natural possa vir a oferecer.

Referências

(*)

ALBERTAZZI P. *et al.* The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. **Obstet. Gynecol.**, v. 91, n.1, p. 6-11, 1998.

AMANN, R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundam. Appl. Pharmacol.**, v. 2, n. 82, p.13-25, 1982.

ANDRADE. A. J. M. *et al.* Screening for in vivo (anti) estrogenic and (anti) androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. **Reg. Toxicol. Pharmacol.**, v.35, p.379-382, 2002.

ANELLI, A. *et al.* Terapia de reposição hormonal e o risco de câncer de mama: avaliação de atitudes em pacientes previamente tratadas por câncer de mama. **Rev. Hosp. Clin.**, v.58, n. 2, p.91-96, 2003.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Ed. Premier, 2000, 569p.

ASHBY, J. *et al.* Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. **J. Appl. Toxicol.**, v.20, p.343–347, 2006b.

ASHBY, J. *et al.* Activity of raloxifene in immature and ovariectomized rat uterotrophic assays. **Reg. Toxicol. Pharmacol.**, v.25, n.3, p.226-231, 1997a.

BAIRD, D. D. *et al.* Dietary intervention study to asses oestrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, p. 1685-1690, 1995.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências – Elaboração . Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. **B. CEPPA.**, v. 23, n.2, p.231-264, 2005.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002, p.601-699.

BOETTGER, T. H. *et al.* A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. **Environ. Health Perspect.**, v.106, p.369–373, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução – RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 mar. 2004.

BROWN, N. M.; SETCHELL, K. D. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab. Invest.*, v.81, p.735–747, 2001.

BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

CHANG, H. C. *et al.* Mass spectrometric determination of genistéina tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. **J. Nutr.**, v.130, p.1963–1970, 2000.

CLAPAUCH, R. *et al.* Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e

Metabologia (SBEM). **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.46, n.6, p.679-695, 2002.

COVENEY, D. *et al.* Effects of oestrogen treatment on testicular descent, inguinal closure and prostatic development in a male marsupial, *Macropus eugenii*. **Reproduction**, v.124, n.1, p. 73-83, 2002.

COWARD L. *et al.* The antitumoral isoflavones genistein and daidzein in soybean food of American and Asian diets. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, p.1961-1967, 1993.

DALSENTER, P. R. *et al.* Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 18, n. 9, p. 583-589, 1999.

DEGEN, G. H. *et al.* Estrogenic isoflavones in rodent diets. **Toxicol. Lett.**, v.128, p.145–157, 2002.

DIEL, P. *et al.* Ability of xeno and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, n.73, p.1–10, 2000.

DIEL, P. *et al.* Phytoestrogens and carcinogenesis-differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. **Hum. Reprod.**, v.16, n.5, p.997-1006, 2001.

DOURSON, M. *et al.* Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II Risk and regulation. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 35, n.3, p. 448-467, 2002.

DUNCAN, A M. *et al.* Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.84, p.192-197, 1999.

EDSTAC – ENDOCRINE SCREENING AND TESTING ADVISORY COMMITTEE. **Screening and testing**. Final Report. Washington, 1998, p. 489-591.

FARMAKALIDIS, E.; HATHCOCK, J. N.; MURPHY, P. A. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v.23, p.741–745, 1985.

FARMAKALIDIS, E.; MURPHY, P. A. Oestrogenic response of the CD-1 mouse to the soya-bean isoflavones genistein, genistin and daidzin. **Food Chem. Toxicol.** v.22, p.237–239, 1984.

CHAMBÔ FILHO, A. *et al.* A soja como alimento funcional em ginecologia. **Rev. Bras. Nutr.**, v. 15, p.326-329, 2000.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBILE, E.; NEIL, J.(Ed). **Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988, p.1893-1928.

FUJIOKA, M. *et al.* Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. **Bras. Soc. Nutr. Sci.**, v.134, p.2623-2627, 2004.

FUKUTAKE, M. *et al.* Quantification of genistein and genistein in soybeans and soybean products. **Food Chem. Toxicol.**, v.34, p.457-461, 1996.

HAN, K. K. *et al.* Efeitos dos fitoestrogênios sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**,v. 24, n. 8, p.547-552, 2002.

HDZISELMOVIC, F. *et al.* Elevated placental estradiol: a possible etiological factor of human cryptorchidism. **J. Urol.**, v.164, n.5, p.1694-1695, 2000.

HOAR W.; HICKMAN C. P. Ovariectomy and the estrus cycle of the rat. In: _____. **General and Comparative Physiology**. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1975, p.260-265.

ISHIMI, Y. *et al.* Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.274, n.3, p.697-701, 2000.

KANG K.S. *et al.* Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague-Dawley rats. **Toxicol Lett.**, v. 118, n. 1-2, p.109-115, 2000.

KING, R.A. *et al.* Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. **Am. J. Clin. Nutr.** v.68, p.1496S–1499S, 1998.

KNIGHT, D.C.; EDEN, J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstet. Gynecol.**, v.87, p.897-904, 1996.

KONDO, H. *et al.* BE – 14384 substances, new specific estrogen-receptor binding inhibitors. Production, isolation, estructure determination and biological properties. **J. Antibiot.**, v.43, p.1533-1542,1990.

LOEFFLER, I.K.; PETERSON, R.E. Interactive effects of TCDD and p,p-DDE on male reproductive tract development in utero and lactationally exposed rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.154, n. 1, p. 28-39, 1999.

LU, F. C.; Toxicology evaluation: assessment of safety/risk. In:_____.**Basic Toxicology**. fundamentals, target, organs, and risk assessment. 2. ed. Miami: Taylor & Francis, 1991b, p. 327-344.

MABLY, T. A.; MOORE, R. W; PETERSON, R.E. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.114, n. 1, p. 97-107, 1992.

MAKELA, S. *et al.* Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.96, n.12, p.7077-7082, 1999.

MARKIEWICZ, L. *et al.* In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** v.45, p.399–405, 1993.

MARTIN, P.M. *et al.* Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. **Endocrinology**, v.93, p. 225-233, 1978.

MARTY, M. S.; CRISSMAN, J. W.; CARNEY, E. W. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 beta-estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. **Toxicol. Sci.**, v.52, n.2, p.269-277, 1999.

McLAHLAN , J A. *et al.* From malformations to molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters. **Apmis**, v. 109, n.4, p.263-272, 2001.

MESSINA, M. Soy, soy phytoestrogens (isoflavones), and breast cancer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 574-575, 1999.

- MORAIS, A. A. C. *et al.* Valor nutritivo e funcional da soja. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v.15, p.316-315, 2000.
- MORITO, K. *et al.* Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. **Biol. Pharm. Bull.**, v.24, n.4, p.351-356, 2001.
- MOSQUETE, R. **Efeito imunohistoquímico, molecular e morfológico das isoflavonas no útero de ratas.** 2004. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- MOSQUETE, R. *et al.* Effects of isoflavones on the adult rat myometrium. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 28, n. 4, p.227-231, 2006.
- ODUM, J. *et al.* Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. **Toxicol. Sci.**, v.61, p.115–127. 2001.
- OSHIMA, M., GU, Y. *Pfaffia paniculata*-induced changes in plasma estradiol-17 β , progesterone and testosterone levels in mice. *J. Reprod. Dev.*, v. 49, n. 2, p.175-180, 2003.
- OTSBY, J. *et al.* The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. **Toxicol. Ind. Health**, v. 15, p. 80-93, 1999.
- PATISAUL, H.B.L.J. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor α - and β -dependent gene expression in the brain. **Endocrinol. Soc.**, v.142, p.2946-2952, 2001.
- PEREIRA, O. C. M. *et al.* Perinatal estrogen exposure: later repercussion on the fertility of rats. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v.118, n. 2, p.241-245, 1997.

PEREIRA, O. C. M. Endocrine disruptors and hypothalamic sexual differentiation. **Annu Rev. Biomed Sci.**, v.5, p.87-94, 2003.

PIKE, A.C. *et al.* Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. **EMBO J.**, v.18, n.17, p.4608-4618, 1991.

PIOVESAN, A. C. *et al.* Efeitos das isoflavonas no tecido mamário. **Femina**, v.32, n.9, p.759-763, 2004.

SALEWSKY, E. Farbemethode zum markroskopischen nachweis von implantatcosstellen am uterus de ratter naunyn schmuderbeys. **Arch. Pharmacol.**, v.247, p.367, 1964.

SANTELL, R. C. *et al.* Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. **J. Nutr.**, v.127, p.263–269, 1997.

SETCHELL K.D. *et al.* Dietary estrogens – a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. **Gastroenterology**, v.93, p.225-233,1987.

SONG, T. T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **J. Agric. Food Chem.**v.47, p.1607–1610, 1999.

TANSEY, G. *et al.* Effects of dietary soybean estrogens on the reproductive tract in female rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.217, p.340–344, 1998.

TOTTA, P.*et al.* Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor-beta in cultured human cancer cells. **J. Nutr.**, v.135, n.11, p.2687-2693, 2005.

U.S. EPA – UNITED STATES. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for developmental toxicity risk assessment**. EPA/600/fr-91/001. Washington, 1991, p.63798-63826.

U.S. EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment**. EPA/630/r-96/009, Washington, 1996, p.56274-56322.

VIGETA, S. M. G. *et al.* Peri-menopausal and post-menopausal experience among women with and without hormone replacement therapy. **Cad. Saude Publica**, v.20, p.1682-1689, 2004.

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. **Environ. Health Perspect.**, v.109, Suppl. 1, p.5–20, 2001.

WHITTEN, P. L.; RUSSELL, E.; NAFTOLIN, F. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. **Steroids**, v.59, p.443–449, 1994.

WUTTKE, W. Soy isoflavones: endocrine disruptors or healthy food supplements? **Physiol. Mini-Rev.**, v. 2, n. 4, p.7, 2006.

YOU, L. *et al.* Combined effects of dietary phytoestrogens and synthetic endocrine-active compound on reproductive development in Sprague-Dawley rats: genistein and methoxychlor. **Toxicol. Sci.**, v.66, n. 1, p. 91-104, 2002.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk assessment approach. In: _____. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, p. 275-309, 1989.

Anexas

Certificado de Análise Galena

Certificado de Análise		Galena [®]
<i>Isoflavona</i>		814
ISOFLAVIN BETA	HIGROSCÓPICO	Seq. 8/13
		31 MAR 2005
		<i>1kg</i>
Data de Fabricação: 11/07/2004 Data de Validade: 11/07/2006 Lote Galena (CIQ): 7041201466		País de Origem: CHINA Lote de Fabricação: 040706 Nota Fiscal: 0651814
Nome Botânico: Glycine max Classe Terapêutica: Fitohormônio		
Produto encontra-se nos seguintes volumes <div style="text-align: center; border: 1px solid black; width: 100px; margin: 0 auto;">1</div>		
ARMAZENAMENTO: Armazenar em temp. inferior a 30°C, em recipiente perfeitamente fechado protegido da luz e umidade.		
Análises/Componentes	Especificações	Resultados das análises
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA		
<ul style="list-style-type: none"> • Descrição * • Doseamento 	Pó amarelo claro a marrom Total isoflavonas: Min. 40,0% Daidzeína + daidzeína: Min. 20% Daidzeína: Min. 12% Genisteína + genisteína: Min. 15% Genisteína: Min. 5,0%	Pó amarelo. Total isoflavonas: 41,1% Daidzeína + daidzeína: 22,7% Daidzeína: 16,9% Genisteína + genisteína: 16,3% Genisteína: 13,1%
<ul style="list-style-type: none"> • Perda por dessecação (1g, 105°, 3 horas) * • Metais pesados • Tamanho da malha • Soja não-transgênica • Densidade aparente * 	Não mais que 5,0% Não mais que 20ppm 100% passa através de 80 Mesh. Conforme Informativo	1,8% Menor que 0,05ppm Conforme Conforme 0,5 g/mL
IDENTIFICAÇÃO		
<ul style="list-style-type: none"> • Identificação 	Positivo	Positivo
MICROBIOLÓGICO		
<ul style="list-style-type: none"> • Fungos e leveduras • Contagem de bactérias • Salmonella spp • Escherichia coli • S aureus • P. aeruginosa 	Não mais que 100cfu/g Não mais que 1000cfu/g Negativo Negativo Negativo Negativo	Menor que 10cfu/g 210cfu/g Negativo Negativo Negativo Negativo
* - Análises realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena. As demais análises estão em acordo com o certificado de análise do fornecedor.		
Resultado: (X) Aprovado	Data da Análise: 22/12/2004	Nr. Ctrl.: 001013G00054136
 Roberto T. Yoshida Farmacêutico Responsável CRF-SP: 18.441		
Isoflavin Beta [®] é o extrato padronizado de Glycine Max L., rico em daidzeína e genisteína, contendo no mínimo 40% de isoflavonas totais.		
		
Este produto atende aos requisitos da BPDF e apresenta segurança e garantia de sua qualidade		
R. Pedro Stanceto, 860 • Campinas • SP • CEP 13082-050 (16) 0909-7014/311 • 0800-142700 • www.galena.com.br		
Verificação de conformidade ISO 9001:2000 		

Tabela 1. Teste uterotrófico, controle negativo, tratado com Propilenoglicol e DMSO, obtido durante 03 dias de tratamento.

Teste Uterotrófico - Controle Negativo (Propilenoglicol e DMSO)				
RATO	Peso Inicial	Peso Final	Peso Úmido Útero	Peso Relativo Útero
	(g)		(mg)	(%)
1	49,23	58,43	30,60	0,05
2	53,20	63,00	30,10	0,05
3	49,57	57,07	22,70	0,04
4	55,47	64,97	31,10	0,05
5	53,16	61,66	26,50	0,04
6	58,60	62,60	30,40	0,05
7	60,20	65,30	33,90	0,05
MÉDIA	54,20	61,86	29,33	0,05
DESVIO	4,19	3,11	3,64	0,0046
EPM	1,58	1,17	1,37	0,0017

Tabela 2. Teste uterotrófico, controle positivo, tratado com Benzoato de Estradiol 0,4mg/Kg, obtido durante 03 dias de tratamento.

Teste Uterotrófico – Tratado com Benzoato de Estradiol 0,4 mg/Kg				
RATO	Peso Inicial	Peso Final	Peso Úmido Útero	Peso Relativo Útero
	(g)		(mg)	(%)
1	55,67	64,04	57,30	0,09
2	53,50	61,55	68,20	0,11
3	53,69	61,47	82,10	0,13
4	52,02	60,22	93,60	0,16
5	61,00	74,00	82,10	0,11
6	55,00	71,80	90,90	0,13
7	65,29	73,66	83,00	0,11
MÉDIA	56,60	66,68	79,60	0,12
DESVIO	4,78	6,20	12,75	0,0210
EPM	1,81	2,34	4,81	0,01

Tabela 3. Teste uterotrófico, controle positivo, tratado com Isoflavona 3,3mg/Kg, obtido durante 03 dias de tratamento.

Teste Uterotrófico - Grupo Tratado com Benzoato de Estradiol 0,4mg/kg				
RATO	Peso Inicial	Peso Final	Peso Úmido Útero	Peso Relativo Útero
	(g)		(mg)	(%)
1	51,68	56,03	30,60	0,05
2	58,96	63,08	31,10	0,05
3	49,06	55,36	31,50	0,06
4	49,03	54,68	31,00	0,06
5	58,26	67,64	36,40	0,05
6	49,91	57,45	32,00	0,06
7	52,05	59,78	23,10	0,04
MÉDIA	52,71	59,15	30,81	0,05
DESVIO	4,20	4,74	3,93	0,0065
EPM	1,59	1,79	1,48	0,0025

Tabela 4. Teste uterotrófico, controle positivo, tratado com Isoflavona 10,0 mg/Kg, obtido durante 03 dias de tratamento.

Teste Uterotrófico – Grupo Tratado com Isoflavona 10,0mg/Kg				
RATO	Peso Inicial	Peso Final	Peso Úmido Útero	Peso Relativo Útero
	(g)		(mg)	(%)
1	52,90	61,20	45,10	0,07
2	49,99	57,82	47,50	0,08
3	51,90	60,40	46,20	0,08
4	51,62	60,62	47,24	0,08
5	53,80	62,80	44,16	0,07
6	59,20	73,00	46,30	0,06
7	52,34	59,30	47,34	0,08
MÉDIA	53,11	62,16	36,17	0,0748
DESVIO	2,93	5,02	1,25	0,0064
EPM	1,11	1,90	0,65	0,0024

Tabela 5. Teste uterotrófico, controle positivo, tratado com Isoflavona 33,3mg/Kg, obtido durante 03 dias de tratamento.

Teste Uterotrófico - Grupo Tratado com Isoflavona 33,3 mg/Kg				
RATO	Peso Inicial	Peso Final	Peso Úmido Útero	Peso Relativo Útero
	(g)		(mg)	(%)
1	50,83	59,22	25,30	0,04
2	53,07	61,07	30,90	0,05
3	49,20	60,02	30,80	0,05
4	49,48	57,13	25,80	0,05
5	54,80	71,20	51,10	0,07
6	58,20	73,40	31,90	0,04
7	56,80	60,60	27,80	0,05
MÉDIA	53,20	63,23	31,94	0,07
DESVIO	3,56	6,35	8,84	0,0101
EPM	1,34	2,40	3,33	0,0038

Tabela 6. Teste uterotrófico, controle positivo, tratado com Isoflavona 100,0mg/Kg, obtido durante 03 dias de tratamento.

Teste Uterotrófico - Grupo Tratado com Isoflavona 100,0mg/Kg				
RATO	Peso Inicial	Peso Final	Peso Úmido Útero	Peso Relativo Útero
	(g)		(mg)	(%)
1	66,80	77,40	34,10	0,06
2	60,40	70,80	35,20	0,07
3	55,20	65,40	34,30	0,07
4	55,40	66,80	32,35	0,06
5	62,80	74,40	35,20	0,06
6	54,20	67,80	33,20	0,07
7	53,74	63,24	34,34	0,07
MÉDIA	58,36	69,41	34,59	0,07
DESVIO	5,04	5,07	1,92	0,0046
EPM	1,90	1,91	0,82	0,0017

Tabela 7. Teste uterotrófico, controle positivo, tratado com Isoflavona 300,0mg/Kg, obtido durante 03 dias de tratamento.

Teste Uterotrófico - Grupo Tratado com Isoflavona 300,0mg/Kg				
RATO	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Peso Úmido Útero (mg)	Peso Relativo Útero (%)
1	52,60	74,00	35,12	0,06
2	62,20	75,80	30,60	0,05
3	53,60	66,70	32,68	0,06
4	54,80	63,60	31,70	0,07
5	48,20	60,60	36,10	0,08
6	46,80	57,60	35,00	0,08
7	52,49	63,14	31,93	0,07
MÉDIA	52,96	65,92	34,39	0,07
DESVIO	5,00	6,76	2,09	0,0085
EPM	1,89	2,55	3,09	0,0032

Tabela 8. Desenvolvimento de camundongos machos (Testículos) - Grupo Controle Negativo - Veículo

Machos - Controle Negativo – Veículo – Testículos				
CAMUNDONGOS	Peso Inicial (g)	Peso 30° dia (g)	Peso Úmido Testículo (mg)	Peso Relativo (%)
1	21,00	34,20	75,90	0,22
2	18,40	35,20	89,00	0,25
3	19,60	36,40	88,60	0,24
4	24,00	37,60	110,00	0,29
5	20,00	42,00	89,00	0,21
6	22,40	36,00	106,00	0,29
MÉDIA	20,90	36,90	93,08	0,25
DESVIO	2,03	2,75	12,6628	0,03
EPM	0,83	1,12	5,17	0,01

Tabela 9 – Variação de peso (g) camundongos grupo Controle

Machos Controle Negativo - Veículo			
CAMUNDONGOS	Inicial	PESO	
		30 dias (g)	Varição peso
1	21,00	34,20	13,20
2	18,40	35,20	16,80
3	19,60	36,40	16,80
4	24,00	37,60	13,60
5	20,00	42,00	22,00
6	22,40	36,00	13,60
MÉDIA	20,90	36,90	16,0000
DESVIO	2,03	2,75	3,3657
EPM	0,83	1,12	1,37

Tabela 10. Desenvolvimento de camundongos machos (Epidídimo) - Grupo Controle Negativo – Veículo

Machos - Controle Negativo – Veículo – Epidídimo				
CAMUNDONGOS	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Epidídimo	Peso Relativo (%)
	Inicial	30º dia		
1	21,00	34,20	27,60	0,08
2	18,40	35,20	29,80	0,08
3	19,60	36,40	25,70	0,07
4	24,00	37,60	33,00	0,09
5	20,00	42,00	36,00	0,09
6	22,40	36,00	31,00	0,09
MÉDIA	20,90	36,90	30,52	0,08
DESVIO	2,03	2,75	3,71	0,01
EPM	0,83	1,12	1,51	0,00

Tabela 11. Desenvolvimento de camundongos machos (Ducto Deferente) - Grupo Controle Negativo - Veículo

Machos - Controle Negativo – Veículo – Ducto Deferente					
CAMUNDONGOS	Inicial	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Ducto Deferente	Peso Relativo (%)
			30° dia		
1	21,00		34,20	11,00	0,03
2	18,40		35,20	11,80	0,03
3	19,60		36,40	10,90	0,03
4	24,00		37,60	12,70	0,03
5	20,00		42,00	10,90	0,03
6	22,40		36,00	14,50	0,04
MÉDIA	20,90		36,90	11,97	0,03
DESVIO	2,03		2,75	1,43	0,00
EPM	0,83		1,12	0,58	0,00

Tabela 12. Desenvolvimento de camundongos machos (Vesícula Seminal) - Grupo Controle Negativo – Veículo

Machos Controle Negativo – Veículo – Vesícula Seminal					
CAMUNDONGOS	Inicial	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Vesícula Seminal	Peso Relativo (%)
			30° dia		
1	21,00		34,20	30,40	0,09
2	18,40		35,20	53,80	0,15
3	19,60		36,40	34,30	0,09
4	24,00		37,60	34,00	0,09
5	20,00		42,00	34,90	0,08
6	22,40		36,00	34,20	0,10
MÉDIA	20,90		36,90	36,93	0,10
DESVIO	2,03		2,75	8,42	0,03
EPM	0,83		1,12	3,44	0,01

Tabela 13. Desenvolvimento de camundongos machos (Epidídimo) - Grupo Tratado Isoflavona 3,3mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 3,3mg/Kg – Testículo				
CAMUNDONGOS	Peso (g)		Peso Úmido (mg)	Peso Relativo (%)
	Inicial	30° dia	Testículo	
1	23,40	36,80	98,20	0,27
2	27,80	39,00	98,00	0,25
3	27,00	37,00	120,40	0,33
4	29,60	40,20	123,00	0,31
5	22,40	39,60	102,00	0,26
6	20,20	34,80	98,50	0,28
MÉDIA	25,07	37,90	106,68	0,28
DESVIO	3,61	2,05	11,75	0,03
EPM	1,48	0,84	4,80	0,01

Tabela 14. Variação de peso (g) do grupo tratado com água enriquecida com 3,3mg de isoflavona

CAMUNDONGOS	Inicial	PESO	
		30 dias (g)	variação peso
1	23,40	36,80	13,40
2	27,80	39,00	11,20
3	27,00	37,00	10,00
4	29,60	40,20	10,60
5	22,40	39,60	17,20
6	20,20	34,80	14,60
MÉDIA	25,07	37,90	12,83
DESVIO	3,61	2,05	2,76
EPM	1,48	0,84	1,13

Tabela 15. Desenvolvimento de camundongos machos (Epidídimo) - Grupo Tratado Isoflavona 3,3mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 3,3 mg/Kg – Epidídimo					
CAMUNDONGOS	Inicial	Peso (g)		Peso Úmido (mg)	Peso Relativo (%)
		30° dia	Epidídimo		
1	23,40	36,80	37,60	0,10	
2	27,80	39,00	37,20	0,10	
3	27,00	37,00	38,52	0,10	
4	29,60	40,20	40,50	0,10	
5	22,40	39,60	36,54	0,09	
6	20,20	34,80	37,69	0,11	
MÉDIA	25,07	37,90	36,20	0,10	
DESVIO	3,61	2,05	1,38	0,01	
EPM	1,48	0,84	1,15	0,00	

Tabela 16. Desenvolvimento de camundongos machos (Ducto Deferente) - Grupo Tratado Isoflavona 3,3mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 3,3mg/Kg – Ducto Deferente					
CAMUNDONGOS	Inicial	Peso (g)		Peso Úmido (mg)	Peso Relativo (%)
		30° dia	Ducto Deferente		
1	23,40	36,80	16,70	0,05	
2	27,80	39,00	10,90	0,03	
3	27,00	37,00	13,20	0,04	
4	29,60	40,20	20,70	0,05	
5	22,40	39,60	10,00	0,03	
6	20,20	34,80	10,40	0,03	
MÉDIA	25,07	37,90	13,65	0,04	
DESVIO	3,61	2,05	4,26	0,01	
EPM	1,48	0,84	1,74	0,00	

Tabela 17. Desenvolvimento de camundongos machos (Vesícula Seminal) - Grupo Tratado Isoflavona 3,3mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 3,3 mg/Kg – Vesícula Seminal					
CAMUNDONGOS	Inicial	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Vesícula Seminal	Peso Relativo (%)
			30° dia		
1	23,40		36,80	39,40	0,11
2	27,80		39,00	55,40	0,14
3	27,00		37,00	49,30	0,13
4	29,60		40,20	36,20	0,09
5	22,40		39,60	21,50	0,05
6	20,20		34,80	37,20	0,11
MÉDIA	25,07		37,90	39,83	0,11
DESVIO	3,61		2,05	11,73	0,03
EPM	1,48		0,84	4,79	0,01

Tabela 18. Desenvolvimento de camundongos machos (Testículo) - Grupo Tratado Isoflavona 100mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 100mg/Kg – Testículo					
CAMUNDONGOS	Inicial	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Testículo	Peso Relativo (%)
			30° dia		
1	20,40		39,00	112,32	0,29
2	20,40		38,80	118,76	0,31
3	21,20		36,80	119,21	0,32
4	21,00		43,80	113,56	0,26
5	17,20		34,40	119,54	0,35
6	23,60		37,20	116,39	0,31
MÉDIA	20,63		38,56	99,25	0,30
DESVIO	2,06		3,15	3,09	0,03
EPM	0,84		1,55	0,72	0,01

Tabela 19 - Variação de peso (g) do grupo tratado com água enriquecida com 100mg de isoflavona

CAMUNDONGOS	PESO		
	Inicial	30 dias	variação
	(g)		peso
1	20,40	39,00	18,60
2	20,40	38,80	18,40
3	21,20	36,80	15,60
4	21,00	43,80	22,80
5	17,20	34,40	17,20
6	23,60	37,20	13,60
MÉDIA	20,63	38,33	17,70
DESVIO	2,06	3,15	3,12
EPM	0,84	1,41	1,39

Tabela 20. Desenvolvimento de camundongos machos (Epidídimo) - Grupo Tratado Isoflavona 100mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 100mg/Kg – Epidídimo				
CAMUNDONGOS	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Epidídimo	Peso Relativo (%)
	Inicial	30° dia		
1	20,40	39,00	43,97	0,11
2	20,40	38,80	45,63	0,12
3	21,20	36,80	44,63	0,12
4	21,00	43,80	45,85	0,10
5	17,20	34,40	45,26	0,13
6	23,60	37,20	45,84	0,12
MÉDIA	20,63	38,56	38,15	0,12
DESVIO	2,06	3,15	0,76	0,01
EPM	0,84	1,55	0,31	0,00

Tabela 22. Desenvolvimento de camundongos machos (Ducto Deferente) - Grupo Tratado Isoflavona 100mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 100 mg/Kg – Ducto Deferente				
CAMUNDONGOS	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Ducto Deferente	Peso Relativo (%)
	Inicial	30° dia		
1	20,40	39,00	9,70	0,02
2	20,40	38,80	9,90	0,03
3	21,20	36,80	13,40	0,04
4	21,00	43,80	11,70	0,03
5	17,20	34,40	11,60	0,03
6	23,60	37,20	12,80	0,03
MÉDIA	20,63	38,56	11,52	0,03
DESVIO	2,06	3,15	1,49	0,01
EPM	0,84	1,55	0,67	0,00

Tabela 23. Desenvolvimento de camundongos machos (Vesícula Seminal) - Grupo Tratado Isoflavona 100mg/100ml

Machos Grupo tratado - Isoflavona 100mg/Kg – Vesícula Seminal				
CAMUNDONGOS	Peso (g)		Peso Úmido (mg) Vesícula Seminal	Peso Relativo (%)
	Inicial	30° dia		
1	20,40	39,00	28,50	0,07
2	20,40	38,80	26,00	0,07
3	21,20	36,80	30,90	0,08
4	21,00	43,80	35,60	0,08
5	17,20	34,40	33,50	0,10
6	23,60	37,20	39,50	0,11
MÉDIA	20,63	38,56	32,33	0,08
DESVIO	2,06	3,15	4,90	0,01
EPM	0,84	1,55	2,19	0,01

Tabela 24. Peso corporal, pesos úmidos e relativos dos úteros e ovários de camundongos fêmeas - Controle Negativo Veículo

Fêmeas - Grupo Controle – Útero e Ovário						
CAMUNDONGOS	Inicial	30° dia	PESO			
			Peso Úmido Útero (mg)	Peso Relativo Útero (%)	Peso Úmido Ovário (mg)	Peso Relativo Ovário (%)
1	18,60	35,40	58,00	0,16	18,00	0,05
2	16,60	29,80	103,00	0,35	17,60	0,06
3	16,00	37,60	54,30	0,14	6,70	0,02
4	20,20	37,00	155,00	0,42	13,00	0,04
5	22,20	37,60	59,00	0,16	18,00	0,05
6	18,00	34,80	68,20	0,20	19,70	0,06
MÉDIA	18,60	35,37	82,92	0,24	15,50	0,04
DESVIO	2,31	2,96	39,57	0,12	4,86	0,02
EPM	0,94	1,21	16,15	0,05	1,98	0,01

Tabela 25. Variação de peso (g) dos camundongos fêmeas que receberam o veículo

CAMUNDONGOS	Inicial	PESO	
		30 dias (g)	variação peso
1	18,60	35,40	16,80
2	16,60	29,80	13,20
3	16,00	37,60	21,60
4	20,20	37,00	16,80
5	22,20	37,60	15,40
6	18,00	34,80	16,80
MÉDIA	18,60	35,37	16,77
DESVIO	2,31	2,96	2,76
EPM	0,94	1,21	1,12

Tabela 26. Peso corporal, pesos úmidos e relativos dos úteros e ovários de camundongos fêmeas – Isoflavona 3,3mg/100ml

Fêmeas - Isoflavona 3,3 mg/Kg – Útero e Ovário						
CAMUNDONGOS	Inicial	30° dia	PESO			
			Peso Úmido Útero (mg)	Peso Relativo Útero (%)	Peso Úmido Ovário (mg)	Peso Relativo Ovário (%)
1	24,80	31,60	99,00	0,31	13,60	0,04
2	22,00	27,00	73,80	0,27	13,50	0,05
3	21,00	27,40	74,20	0,27	11,20	0,04
4	26,80	30,20	73,50	0,24	12,00	0,04
5	19,60	29,80	88,70	0,30	9,90	0,03
6	21,00	34,80	109,70	0,32	23,30	0,07
MÉDIA	22,53	30,13	86,48	0,29	13,92	0,05
DESVIO	2,72	2,88	15,37	0,03	4,81	0,01
EPM	1,11	1,17	6,27	0,01	1,96	0,00

Tabela 27. Variação de peso (g) dos camundongos fêmeas que receberam água enriquecida com 3,3mg de isoflavona

CAMUNDONGOS	Inicial	PESO	
		30 dias (g)	variação peso
1	24,80	31,60	6,80
2	22,00	27,00	5,00
3	21,00	27,40	6,40
4	26,80	30,20	3,40
5	19,60	29,80	10,20
6	21,00	34,80	13,80
MÉDIA	22,53	30,13	7,60
DESVIO	2,72	2,88	3,79
EPM	1,11	1,17	1,55

Tabela 28. Peso corporal, pesos úmidos e relativos dos úteros e ovários de camundongos fêmeas – Isoflavona 100mg/100ml

Fêmeas - Isoflavona 100mg/Kg						
CAMUNDONGOS	Inicial	30° dia	PESO			
			Peso Útero (mg)	Peso Relativo Útero (%)	Peso Útero Ovário (mg)	Peso Relativo Ovário (%)
1	19,00	34,30	131,24	0,38	13,40	0,04
2	22,60	32,20	126,63	0,39	16,70	0,05
3	21,60	39,60	123,52	0,31	13,30	0,03
4	22,80	33,60	137,56	0,41	15,30	0,05
5	20,60	42,20	133,00	0,32	19,10	0,05
6	24,00	29,70	145,00	0,49	22,80	0,08
MÉDIA	21,77	35,27	132,83	0,38	16,77	0,05
DESVIO	1,78	4,71	7,72	0,07	3,67	0,02
EPM	0,73	1,92	3,15	0,03	1,50	0,01

Tabela 29. Variação de peso (g) dos camundongos fêmeas que receberam água enriquecida com 100mg de isoflavona

CAMUNDONGOS	Inicial	PESO	
		30 dias (g)	variação peso
1	19,00	34,30	15,30
2	22,60	32,20	9,60
3	21,60	39,60	18,00
4	22,80	33,60	10,80
5	20,60	42,20	21,60
6	24,00	29,70	5,70
MÉDIA	21,77	35,27	13,50
DESVIO	1,78	4,71	5,87
EPM	0,73	1,92	2,40

Tabela 30. Comparação de peso corporal de ratas no período gestacional do Grupo Controle

Fêmeas período gestação – Grupo Controle						
Rato	PESO					
	1º dia	4º dia	8º dia	12º dia	16º dia	18º dia
	(g)					
1	231,00	234,60	241,50	235,30	237,60	237,80
2	233,60	235,40	251,60	277,60	288,80	310,80
3	254,30	257,10	264,10	269,20	271,00	277,20
4	257,20	261,20	266,50	270,90	276,20	278,60
5	272,00	275,00	280,30	285,60	295,20	298,00
6	262,20	267,60	272,90	277,30	283,00	286,50
7	257,60	261,50	268,60	273,30	279,20	278,60
8	206,10	209,00	231,50	237,40	244,10	248,50
9	235,80	240,60	247,20	252,80	258,60	257,80
10	238,70	242,20	248,00	256,20	260,30	266,00
11	226,20	231,50	237,30	243,00	247,20	248,50
12	220,70	223,80	226,20	231,50	240,00	240,90
13	246,30	250,90	256,10	263,90	268,10	269,00
14	206,40	211,12	218,20	226,00	232,20	233,00
15	219,80	223,20	229,00	236,10	240,50	245,30
16	204,10	207,60	211,40	218,80	221,30	224,00
17	247,00	251,70	257,70	265,00	269,10	269,30
18	223,40	228,90	232,90	237,00	243,10	247,20
19	180,60	200,20	216,30	232,80	244,80	251,00
20	203,20	216,60	230,40	246,90	258,90	266,20
21	157,00	160,60	179,20	195,70	207,70	214,70
22	158,20	194,40	210,00	226,50	238,50	245,00
23	205,20	216,20	234,40	250,90	262,90	269,40
24	258,00	270,10	188,60	205,10	218,10	224,60
25	208,20	223,40	238,40	254,90	267,90	274,40
26	200,50	214,60	228,60	244,20	257,70	264,20
27	215,00	223,50	238,50	255,00	269,00	269,80
28	220,00	232,40	247,40	263,90	277,70	284,70
29	189,30	213,00	227,50	244,00	257,80	264,30
30	221,00	212,60	227,60	244,10	259,10	265,90
MÉDIA	221,95	229,68	236,93	247,36	255,85	260,37
DESVIO	28,84	25,33	23,12	21,36	21,09	22,10
EPM	5,26	4,62	4,22	3,89	3,85	4,03

Tabela 31. Peso corporal no período de gestação em ratos fêmeas no grupo tratado Isoflavona 10mg/Kg

Fêmeas período gestação - Tratado 10 mg/Kg						
Rato	1º dia	4º dia	PESO			
			8º dia	12º dia	16º dia	18º dia
(g)						
1	252,80	255,20	266,20	297,60	317,80	300,00
2	199,60	201,00	215,60	242,60	258,20	258,80
3	216,60	218,80	224,90	259,70	277,60	278,30
4	204,30	206,20	217,20	248,64	265,80	267,00
5	242,80	244,80	254,20	284,50	306,80	313,80
6	222,00	226,00	236,00	262,00	285,40	277,20
7	229,80	231,80	239,80	245,60	276,40	281,80
8	206,52	208,40	220,10	248,30	283,20	288,60
9	213,27	215,80	227,50	259,20	276,80	289,30
10	219,10	221,80	232,20	239,80	257,00	254,80
11	245,20	251,00	259,30	267,60	273,20	276,00
12	246,60	250,60	264,20	275,20	280,50	286,20
13	238,30	245,00	253,00	266,50	274,80	277,20
14	244,90	249,80	263,40	271,20	277,00	279,00
15	236,20	241,30	248,20	260,00	264,20	271,00
16	230,80	234,80	242,00	252,30	257,20	258,30
17	220,30	224,70	230,80	241,00	250,00	257,10
18	223,60	224,80	229,00	235,80	251,30	255,00
19	218,00	223,60	230,00	237,00	243,10	253,60
20	247,00	251,60	258,90	266,30	271,00	278,10
21	204,10	208,30	216,30	223,00	229,80	236,50
22	206,52	208,40	220,10	248,30	283,20	288,60
23	216,60	218,80	224,90	259,70	277,60	278,30
24	247,00	251,60	258,90	266,30	271,00	278,10
25	238,30	245,00	253,00	266,50	274,80	277,20
26	200,20	201,00	215,60	242,60	258,20	258,80
27	218,00	223,60	230,00	237,00	243,10	253,60
28	236,20	241,30	248,20	260,00	264,20	271,00
29	238,30	245,00	253,00	266,50	274,80	277,20
30	217,40	222,10	233,50	240,10	252,20	260,60
MÉDIA	226,01	229,74	238,86	255,69	269,21	272,70
DESVIO	16,02	17,01	16,52	16,12	18,08	16,01
EPM	2,96	3,10	3,01	2,94	3,30	2,92

Tabela 32. Peso corporal no período de gestação em ratos fêmeas no grupo tratado Isoflavona 100mg/Kg

Fêmeas período gestação - Tratado 100mg/Kg						
Rato	1º dia	4º dia	PESO			
			8º dia	12º dia	16º dia	18º dia
			(g)			
1	216,30	218,20	214,80	215,90	218,80	223,00
2	200,60	202,40	201,30	246,30	251,00	253,20
3	201,80	207,20	213,60	258,70	270,20	273,40
4	231,00	236,60	241,50	235,30	237,60	237,80
5	214,10	216,40	221,30	212,20	216,60	210,00
6	233,60	235,40	251,60	277,60	288,80	310,80
7	296,00	298,40	208,90	200,60	201,00	203,00
8	211,50	213,60	211,20	208,20	210,40	216,80
9	252,80	255,20	266,20	297,60	317,80	291,40
10	233,40	236,40	240,00	213,80	237,80	234,60
11	199,60	201,00	215,60	242,60	258,20	254,80
12	216,60	218,80	224,90	259,70	277,60	277,60
13	204,30	206,20	217,20	248,64	265,80	267,00
14	198,90	201,40	223,20	262,30	278,80	287,20
15	242,80	244,80	254,20	284,50	306,80	295,98
16	222,00	226,00	236,00	262,00	285,40	277,20
17	248,80	252,20	257,00	243,20	264,80	270,00
18	229,80	231,80	239,80	245,60	276,40	281,80
19	216,60	221,80	232,20	239,80	258,30	254,80
20	216,30	218,20	214,80	215,90	221,00	223,00
21	200,60	202,40	201,30	246,30	261,30	253,20
22	201,80	208,30	213,60	258,70	273,50	273,40
23	231,00	236,50	241,50	235,30	258,21	237,80
24	214,10	218,50	221,30	212,20	218,50	210,00
25	233,60	236,20	251,60	277,60	285,60	284,32
26	296,00	297,50	208,90	200,60	212,20	203,00
27	211,50	215,60	211,20	208,20	213,50	216,80
28	252,80	256,40	265,80	297,60	316,90	291,40
29	233,40	237,20	243,50	213,80	238,50	234,60
30	199,60	215,40	216,40	242,60	260,10	254,80
MÉDIA	225,46	228,87	228,68	242,11	256,05	253,42
DESVIO	25,21	24,72	19,02	28,06	32,41	31,01
EPM	4,60	4,51	3,47	5,12	5,92	5,66

Tabela 33. Duração do período gestacional em ratas

Duração da gestação			
Ratas	Grupo Controle	Isoflavona 10mg/kg	Isoflavona 100mg/Kg
1	22	19	21
2	21	20	20
3	21	20	20
4	21	19	20
5	22	19	20
6	21	19	20
7	21	20	20
8	21	20	21
9	21	20	21
10	22	19	21
MÉDIA	21,30	19,50	20,40
DESVIO	0,48	0,53	0,52
EPM	0,15	0,16	0,16

Tabela 34. Laparotomia exploratória e taxas do Grupo Controle

18° G.D. Laparotomia e Taxas - Grupo Controle							
Rato	Corpos Lúteos	Fetos Vivos	Fetos Lise	Sítios Reabsorção	Sítios Implantação	TAXAS DE PERDAS (%)	
						Pré Implantação	Pós Implantação
1	12	11	0	2	11	8,33	0,00
2	10	10	0	0	10	0,00	0,00
3	10	10	0	0	10	0,00	0,00
4	10	10	0	0	10	0,00	0,00
5	10	9	0	1	9	10,00	0,00
6	10	10	0	0	10	0,00	0,00
7	11	10	0	0	10	9,09	0,00
8	12	11	0	2	11	8,33	0,00
9	10	10	0	0	10	0,00	0,00
10	10	10	0	0	10	0,00	0,00
11	11	10	0	1	10	9,09	0,00
12	10	10	0	0	10	0,00	0,00
13	10	9	1	0	9	10,00	0,00
14	10	10	0	0	10	0,00	0,00
15	11	11	0	0	11	0,00	0,00
16	10	10	0	0	10	0,00	0,00
17	10	10	0	0	10	0,00	0,00
18	10	10	0	0	10	0,00	0,00
19	10	9	0	1	9	10,00	0,00
20	10	10	0	0	10	0,00	0,00
MÉDIA	10,35	10,00	0,05	0,35	10,00	3,38	0,02
DESVIO	0,67	0,56	0,23	0,67	0,56	16,23	0,00
EPM	0,15	0,13	0,05	0,15	0,12	3,61	0,00

Tabela 35. Laparotomia exploratória e taxas do Grupo Isoflavona 10mg/Kg

18° G.D. - Laparotomia e Taxas - Isoflavona 10mg/Kg							
Rato	Corpos Lúteos	Fetos Vivos	Fetos Lise	Sítios Reabsorção	Sítios Implantação	TAXAS DE PERDAS (%)	
						Pré Implantação	Pós Implantação
1	10	8	2	0	8	20,00	0,00
2	10	7	2	1	7	30,00	0,00
3	11	9	2	0	9	18,18	0,00
4	11	10	1	0	10	9,09	0,00
5	10	10	0	0	10	0,00	0,00
6	10	9	0	1	9	10,00	0,00
7	11	10	1	0	10	9,09	0,00
8	9	8	1	0	8	11,11	0,00
9	10	0	10	0	0	100,00	0,00
10	10	7	2	0	0	100,00	0,00
11	10	8	2	0	8	20,00	0,00
12	10	7	2	0	7	30,00	0,00
13	11	9	2	0	9	18,18	0,00
14	10	6	1	2	6	40,00	0,00
15	10	7	2	0	0	100,00	0,00
16	10	8	2	0	8	20,00	0,00
17	9	8	1	0	8	11,11	0,00
18	10	7	2	0	7	30,00	0,00
19	10	9	0	1	9	10,00	0,00
20	10	7	2	0	7	30,00	0,00
MÉDIA	10,10	7,70	1,85	0,25	7,00	23,05	0,00
DESVIO	0,55	2,15	2,06	0,55	3,21	30,08	0,00
EPM	0,12	0,48	0,46	0,12	0,71	6,68	0,00

Tabela 36. Laparotomia exploratória e taxas do Grupo Isoflavona 100mg/Kg

18° GD - Laparotomia e Taxas - Isoflavona 100mg/Kg							
Rato	Corpos Lúteos	Fetos Vivos	Fetos Lise	Sítios Reabsorção	Sítios Implantação	TAXAS DE PERDAS (%)	
						Pré Implantação	Pós Implantação
1	9	7	0	2	0	100,00	0,00
2	10	10	0	0	10	0,00	0,00
3	11	11	0	0	11	0,00	0,00
4	11	10	0	0	11	0,00	9,09
5	10	10	0	0	10	0,00	0,00
6	11	9	1	1	10	9,09	10,00
7	11	11	0	0	11	0,00	0,00
8	10	9	0	0	10	0,00	10,00
9	10	0	10	0	0	100,00	0,00
10	11	0	7	4	0	100,00	0,00
11	10	9	0	0	10	0,00	10,00
12	10	3	0	0	3	70,00	0,00
13	7	0	6	0	0	100,00	0,00
14	8	0	8	0	0	100,00	0,00
15	9	0	9	0	0	100,00	0,00
16	9	0	9	0	0	100,00	0,00
17	7	0	7	0	0	100,00	0,00
18	9	7	0	2	0	100,00	0,00
19	11	9	0	0	10	9,09	10,00
20	8	0	6	0	0	100,00	0,00
MÉDIA	9,60	5,25	3,15	0,45	4,80	54,41	2,45
DESVIO	1,31	4,71	3,96	1,05	5,19	49,13	4,37
EPM	0,29	1,05	0,88	0,23	1,16	10,92	0,97

Tabela 37. Desenvolvimento filhotes machos – Grupo Controle

Avaliação desenvolvimento dos filhotes machos – Grupo Controle									
Rato	PESO				Surg. Pêlos	Abert. Olhos	Desloc. Orelhas	Desc. Testicular	Sep prepucial
	1° P.N.	7° P.N.	14° P.N.	21° P.N.					
	(g)				(dia pós-natal)				
1	7,20	9,30	25,20	54,20	8	14	8	18	38
2	7,20	12,40	20,30	51,60	9	15	9	18	37
3	7,00	12,70	25,10	52,20	8	14	9	18	37
4	7,40	12,90	22,00	53,80	8	14	9	18	37
5	7,20	12,80	21,80	58,40	8	14	9	18	38
6	7,00	11,60	23,60	65,40	9	14	9	18	38
7	7,20	13,80	22,50	66,60	8	14	8	18	37
8	7,60	12,60	27,50	68,60	9	14	8	20	38
9	7,50	12,70	25,60	66,20	9	15	8	22	38
10	6,00	9,00	28,00	66,40	9	15	8	21	37
11	6,50	8,00	25,90	58,90	9	15	8	22	37
12	5,20	8,40	25,50	55,80	9	15	9	22	37
13	7,50	12,50	26,43	62,30	8	14	9	21	38
14	7,00	11,70	25,80	55,40	8	14	9	19	37
15	6,70	8,20	26,80	62,10	9	14	9	24	37
16	6,10	8,60	25,30	63,60	9	15	9	23	38
17	5,50	10,20	24,50	63,90	7	12	9	20	37
18	6,60	10,30	23,80	61,10	8	14	9	20	38
19	6,50	10,50	25,40	59,20	7	14	9	22	38
20	6,00	13,40	26,90	54,90	7	14	9	22	38
MÉDIA	6,75	11,08	24,90	60,03	8,30	14,20	8,70	20,20	37,50
DESVIO	0,69	1,94	2,02	5,32	0,73	0,70	0,47	1,99	0,51
EPM	0,15	0,43	0,45	1,19	0,16	0,16	0,11	0,45	0,11

Tabela 38. Desenvolvimento filhotes machos – grupo tratado Isoflavona 10mg/Kg

Avaliação desenvolvimento dos filhotes machos - Grupo Isoflavona 10mg/Kg									
Rato	PESO				Surg. Pêlos	Abert. Olhos	Desloc. Orelhas	Desc. Testicular	Sep préucial
	1° P.N	7° P.N.	14° P.N.	24° P.N.					
(g)									
1	7,00	15,40	19,00	39,00	7	14	8	19	36
2	8,00	16,80	20,80	33,60	7	15	7	18	37
3	8,20	15,40	18,40	39,80	7	15	7	17	37
4	7,80	15,40	21,60	35,40	8	14	7	18	37
5	8,20	16,80	20,40	32,50	7	15	7	18	36
6	7,60	15,00	19,00	39,20	7	15	7	18	38
7	7,60	13,00	21,80	32,50	7	15	7	19	38
8	7,50	13,80	22,40	37,20	8	14	8	17	37
9	7,40	14,00	20,40	38,50	8	14	8	17	36
10	8,60	11,80	17,80	36,20	7	15	8	17	36
11	7,80	15,40	21,60	35,40	8	14	7	18	37
12	7,00	15,40	19,00	39,00	7	14	8	19	36
13	8,20	13,60	21,70	38,20	7	14	7	18	36
14	8,20	15,40	18,40	39,80	7	15	7	17	37
15	7,50	13,80	22,40	37,20	8	14	8	17	37
16	7,80	15,40	21,60	35,40	8	14	7	18	37
17	8,20	13,60	21,70	38,20	7	15	7	18	36
18	7,40	14,00	20,40	38,50	8	14	8	17	36
19	8,60	11,80	17,80	36,20	7	15	8	17	36
20	8,20	13,60	21,70	38,20	7	14	7	18	36
MÉDIA	7,84	14,47	20,40	37,00	7,35	14,45	7,40	17,75	36,60
DESVIO	0,46	1,40	1,57	2,28	0,49	0,51	0,50	0,72	0,68
EPM	0,10	0,31	0,35	0,51	0,11	0,11	0,11	0,16	0,15

Tabela 39. Desenvolvimento filhotes machos grupo tratado Isoflavona 100mg/Kg

Avaliação desenvolvimento dos filhotes machos –Grupo Isoflavona 100 mg/Kg									
Rato	PESO				Surg. Pêlos	Abert. Olhos	Desloc. Orelhas	Desc. Testicular	Sep preúcial
	1° P.N	7° P.N.	14° P.N.	21° P.N.					
	(g)				(dia pós-natal)				
1	7,00	11,70	20,30	31,60	8	15	7	19	36
2	7,00	12,00	19,80	38,20	8	15	8	19	37
3	6,00	11,70	19,70	41,50	8	15	8	19	37
4	6,00	11,10	19,30	34,90	9	16	8	18	37
5	6,80	11,70	19,40	41,60	9	15	8	18	36
6	6,00	11,60	20,30	39,70	8	15	8	18	38
7	6,20	11,30	21,40	41,00	8	15	8	18	37
8	6,10	11,40	20,00	41,60	8	15	8	19	36
9	6,00	11,00	20,80	38,30	8	15	7	19	38
10	6,36	12,00	20,06	41,50	8	15	8	18	37
11	6,00	11,10	19,30	39,70	8	15	8	19	37
12	7,00	11,70	20,30	31,60	8	15	7	19	37
13	7,00	12,00	19,80	38,20	8	15	7	17	36
14	6,00	11,70	19,70	41,50	8	15	7	19	37
15	6,00	11,10	19,30	34,90	9	16	8	18	37
16	6,80	11,70	19,40	41,60	9	15	7	18	36
17	6,00	11,60	20,30	39,70	8	15	8	17	37
18	6,20	11,30	21,40	41,00	8	15	8	18	38
19	6,10	11,40	20,00	41,60	8	15	7	19	38
20	6,00	11,00	20,80	38,30	8	15	8	19	38
MÉDIA	6,33	11,51	20,07	38,90	8,20	15,10	7,65	18,40	37,00
DESVIO	0,42	0,33	0,65	3,25	0,41	0,31	0,49	0,68	0,73
EPM	0,0,09	0,07	0,14	0,73	0,09	0,07	0,11	0,15	0,16

Tabela 40. Desenvolvimento filhotes fêmeas grupo Controle

Desenvolvimento Filhotes Fêmeas – Grupo Controle								
Rato	PESO				Surg. Pêlos	Abert. Olhos	Desloc. Orelhas	Abertura canal vaginal
	1° P.N.	7° P.N.	14° P.N.	21° P.N.				
	(g)				(dia pós-natal)			
1	5,80	9,00	24,70	47,20	7	15	9	38
2	7,20	11,30	23,70	48,00	7	13	8	38
3	6,40	11,80	25,50	45,80	8	14	9	38
4	6,60	12,30	26,00	46,70	8	14	9	37
5	6,90	10,80	23,80	44,60	8	14	9	38
6	6,50	10,00	19,80	31,70	9	14	9	38
7	6,30	10,30	19,20	27,30	9	14	9	38
8	5,60	11,20	21,00	43,60	8	15	9	39
9	6,70	12,00	23,50	46,20	8	13	9	38
10	6,90	12,00	24,20	45,80	8	14	8	38
11	5,70	10,30	19,20	48,10	8	16	9	38
12	6,50	11,00	25,20	39,50	8	14	9	39
13	7,30	9,45	23,20	41,20	8	14	8	39
14	7,40	11,30	20,20	39,60	9	15	8	40
15	7,20	11,70	20,60	39,50	8	14	8	38
16	7,40	13,50	20,90	39,30	8	14	8	38
17	7,30	13,50	21,20	37,30	8	14	8	38
18	6,50	12,80	21,60	37,80	9	14	9	38
19	6,80	13,80	21,50	46,50	8	14	9	38
20	7,50	12,60	23,20	37,90	9	14	8	38
21	7,50	12,80	25,60	45,80	9	15	8	38
22	6,50	10,30	20,00	49,90	9	15	9	38
23	6,30	10,00	18,60	48,70	9	15	9	40
24	6,20	9,50	19,80	40,70	9	15	9	38
25	7,30	12,80	19,00	42,20	8	14	8	39
26	7,40	11,30	20,20	49,20	9	15	8	38
27	7,30	11,70	21,60	39,50	8	14	8	39
MÉDIA	6,78	11,45	21,96	42,58	8,30	14,30	8,56	38,30
DESVIO	0,57	1,32	2,29	5,46	0,61	0,67	0,51	0,67
EPM	0,11	0,25	0,44	1,05	0,12	0,13	0,10	0,13

Tabela 41. Desenvolvimento filhotes fêmeas grupo Isoflavona 10mg/Kg

Desenvolvimento Filhotes Fêmeas – Grupo Isoflavona 10mg/Kg								
Rato	PESO				Surg. Pêlos	Abert. Olhos	Desloc. Orelhas	Abertura canal vaginal
	1° P.N	7° P.N.	14° P.N.	24° P.N.				
	(g)				(dia pós-natal)			
1	8,60	9,50	21,10	38,50	8	15	7	37
2	8,20	10,10	18,50	39,80	7	15	7	37
3	7,80	9,50	20,50	39,40	8	15	7	37
4	7,30	11,30	20,40	37,50	8	15	7	38
5	7,20	10,20	19,50	37,80	8	15	8	38
6	7,50	10,00	18,90	36,70	9	15	9	38
7	7,50	10,40	19,70	36,90	7	15	8	38
8	7,20	10,50	19,50	35,60	9	16	8	38
9	7,20	12,10	21,00	37,49	9	17	8	37
10	7,70	10,70	19,54	36,80	9	16	7	37
11	7,45	13,50	19,50	37,30	9	17	8	37
12	7,65	10,30	22,30	36,85	8	17	7	38
13	8,00	11,70	20,50	37,80	8	15	8	37
14	7,34	10,50	22,80	37,20	8	15	8	37
15	7,61	11,90	21,40	38,30	8	15	8	37
16	7,60	12,40	18,90	37,40	8	15	8	37
17	6,80	12,40	20,10	37,50	6	15	7	37
18	7,30	11,80	21,00	37,40	8	15	7	38
19	7,30	10,40	23,10	37,68	9	15	7	38
20	7,00	11,50	24,30	36,70	8	15	8	38
21	6,92	13,50	20,90	32,80	6	16	8	39
22	7,60	12,10	23,50	33,60	6	17	7	39
MÉDIA	7,49	11,20	20,77	37,14	7,91	15,50	7,59	37,59
DESVIO	0,42	1,18	1,59	1,57	0,97	0,80	0,59	0,67
EPM	0,09	0,25	0,34	0,33	0,21	0,17	0,13	0,14

Tabela 42. Desenvolvimento filhotes fêmeas grupo Isoflavona 100mg/Kg

Desenvolvimento Filhotes Fêmeas - Grupo Isoflavona 100mg/Kg								
Rato	PESO				Surg. Pêlos	Abert. Olhos	Desloc. Orelhas	Abertura canal vaginal
	1° P.N.	7° P.N.	14° P.N.	24° P.N.				
	(g)				(dia pós-natal)			
1	7,20	9,30	22,20	40,00	8	15	7	38
2	7,20	12,40	19,20	39,60	7	15	7	38
3	7,00	12,70	20,60	39,40	8	15	7	37
4	7,40	12,90	20,90	39,30	8	15	7	37
5	7,20	12,80	21,00	37,30	8	15	8	38
6	7,00	11,60	20,60	37,80	9	15	9	38
7	7,20	13,80	21,60	36,30	7	15	8	37
8	7,50	12,60	17,10	37,90	9	16	8	37
9	7,50	12,70	15,60	25,80	9	17	8	38
10	6,70	9,00	16,80	29,80	9	16	7	38
11	6,50	8,00	15,90	26,70	9	17	8	38
12	6,70	8,40	15,50	29,50	8	17	7	39
13	7,30	12,50	19,00	30,70	8	15	8	37
14	7,20	10,30	22,20	37,50	8	15	8	40
15	7,20	13,20	19,20	35,20	8	15	8	37
16	7,10	11,78	22,70	30,40	8	15	8	38
17	7,40	14,30	21,60	38,50	6	15	7	37
18	7,30	15,50	22,10	35,30	8	15	7	38
19	7,00	12,20	21,70	35,80	9	15	7	38
20	7,30	14,30	21,65	35,30	8	15	8	38
21	7,60	12,60	18,30	28,80	6	16	8	37
22	7,60	12,70	17,30	25,80	6	17	7	37
23	6,45	10,00	17,30	26,80	8	16	7	40
24	6,50	9,00	16,60	26,70	8	17	7	38
25	6,50	8,40	16,30	23,90	8	17	9	39
26	8,00	13,20	20,00	30,70	6	15	7	37
27	7,60	10,20	23,20	38,60	6	15	7	39
28	7,80	12,40	19,20	34,70	6	15	7	39
29	7,20	12,75	21,60	35,40	7	15	9	38
MEDIA	7,18	11,78	19,55	33,43	7,69	15,55	7,59	37,93
DESVIO	0,40	1,98	2,41	5,07	1,04	0,83	0,68	0,88
EPM	0,07	0,37	0,45	0,94	0,19	0,15	0,13	0,16

Tabela 43. Avaliação da fase do ciclo estral em 15 dias consecutivos de ratas do grupo Controle

Ciclo Estral – Grupo Controle															
Rata	Dias de Observação														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	E	M	M	M-D	E	M	M	D	E	M	D	P-E	E	M	M
2	M	D-P	E	M	D	P	E	M	M	D-P	E	M	M	M-D	E
3	M	D	P-E	E	M	M	P	E	M	M	D	P-E	M	M-D	P-E
4	M	M-D	E	M	M	P-E	E	M	M	D-P	E	M	M	P	E
5	E	M	M	M-D	E	M	M	D	E	M	D	P-E	E	M	M
6	E	M	M	M-D	E	M	D	P-E	E	M	D	P-E	E	M	M
7	M-D	E	M	M	P-E	E	M	M	D	E	M	D	E	E	M
8	E	M	M	M-D	E	M	M	D	E	M	D	P-E	E	M	M
9	D-P	E	M	M	D-P	E	M	M	E	M	M	D	D-P	E	M
10	D	D-P	P-E	E	M	D	P-E	E	M	D	P	E	M	M-D	P-E
11	D-P	P-E	E	M	D	P	E	E-M	D	D-P	P	P-E	E	M	D
12	P-E	E	M	M-D	P-E	E	M	D	D	D-P	E	M	M-D	D	P-E
13	D-P	P-E	E	M	D	P	E	E-M	D	D-P	P	P-E	E	M	D
14	P-E	E	M	M	D	D-P	P-E	E	M	M-D	P	P-E	E	M	D
15	D	D-P	P-E	E	M	D	P-E	E	M	D	D	E	M	M-D	P

D = diestro P = proestro E = estro M = metaestro

Tabela 44. Avaliação da fase do ciclo estral em 15 dias consecutivos de ratas do grupo Isoflavona 10mg/kg.

Ciclo Estral – Grupo Isoflavona 10mg/kg															
Rata	Dias de Observação														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	E	E	M	M-D	E	M	M	D	E	M	M	P-E	E	M	M
2	D-P	E	M	M	D-P	E	M	M	E	M	M	D	D-P	E	M
3	M	M	D-P	E	M	E	M	E	M	M-D	P-E	E	M-D	D	P-E
4	E	E	M	M-D	E	M	M	D	E	M	M	P-E	E	M	M
5	M	D	D	P	E	M	M	D	D-P	E	M	M	M	D-P	E
6	D-P	E	M	M	D-P	E	E	M	M	E	M	M	D-P	E	M
7	M	D	P-E	E	M	M	P	E	M	M	D	P-E	M	M-D	P-E
8	M	M-D	P-E	E	M	M	M	P-E	E	E	M	M	M	P-E	E
9	M	P-E	E	M	D	P-E	E	M	M	P-E	E	M	M	P-E	E
10	P	E	M	M	D	D	E	M	M-D	P-E	E	M	M-D	D-P	É
11	M	D	P-E	E	M	E	P	E	M	M	D	P-E	M	M-D	P-E
12	D	E	M	M	M-D	E	M	M	D	P-E	M	D	P-E	E	M
13	M	M-D	P-E	E	M	M	M	P-E	E	E	M	M	M	P-E	E
14	M-D	E	E	M	M	M-D	P-E	E	M	M	D	E	M	M	M
15	D	D-P	D-E	E	M	D	P-E	E	M	D	P	E	M	M	P-E

D = diestro P = proestro E = estro M = metaestro

Tabela 45. Avaliação da fase do ciclo estral em 15 dias consecutivos de ratas do grupo Isoflavona 100mg/kg

Ciclo Estral – Grupo Isoflavona 100mg/kg															
Rata	Dias de Observação														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	D	P- E	E	M	M	M- D	P- E	M	D	D- P	E	M	M- D	P	E
2	M	D- P	E	M	D	P	E	M	M	D- P	E	M	M	M- D	E
3	M	M	D- P	E	M	E	M	E	M	M- D	P- E	E	M- D	D	P- E
4	M	M	D	E	M	E	M	E	M	D	P- E	E	M- D	D	D
5	M	D	D	P	E	M	M	D	D- P	E	M	M	M	D- P	E
6	M	D	P- E	E	M	M	P	E	M	M	D	P- E	M	M- D	P- E
7	M- D	E	M	M	P- E	E	M	M	D	E	M	D	E	E	M
8	M	M	P- E	E	M	M	M	P- E	E	E	M	M	M	P- E	P
9	M	P- E	E	M	D	P- E	E	M	M	P- E	E	M	M	P- E	E
10	P	E	M	M	D	D	E	M	M- D	P- E	E	M	M- D	D- P	E
11	M	D	P- E	E	M	M	P	E	M	M	D	P- E	M	M- D	P- E
12	D	E	M	M	M- D	E	M	M	D	P- E	M	D	P- E	E	M
13	P- E	E	M	D	P- E	E	M	M- D	P- E	E	M	M	P	P- E	E
14	D- P	E	M	M	D- P	E	E	M	M	E	M	M	D- P	E	M
15	M	D	P- E	E	M	M	P	E	M	M	M- D	P- E	M	M- D	P- E

D = diestro P = proestro E = estro M = metaestro

Tabela 46. Duração do estro em horas obtido da verificação da fase do ciclo estral em 15 dias consecutivos dos grupos Controle, Isoflavona 10mg/kg e Isoflavona 100mg/kg.

Duração do Estro			
Dias	Controle	Isoflavona 10mg/kg	Isoflavona 100mg/kg
1	24/24/24=24	48/24/24/24=30	24/24/24/24=24
2	24/24/24=24	24/24/24/24=24	24/24/24=24
3	24/24/24=24	24/24/24/24=24	24/24/24/24=24
4	24/24/24/24=24	48/24/24/24=30	24/24/24=24
5	24/24/24=24	24/24/24=24	24/24/24=24
6	24/24/24/24=24	24/48/24/24=30	24/24/24=24
7	24/24/24/48=30	24/24/24=24	24/24/24/48=30
8	24/24/24=24	24/48/24=32	24/48/24=32
9	24/24/24/24=24	24/24/24/24=24	24/24/24/24=24
10	24/24/24=24	24/24/24/24=24	24/24/24/24=24
11	24/24/24=24	24/24/24=24	24/24/24=24
12	24/24/24=24	24/24/24=24	24/24/24=24
13	24/24/24=24	24/48/24=32	24/24/24/24=24
14	24/24/24=24	48/24/24=32	24/48/24/24=30
15	24/24/24/24=24	24/24/24=24	24/24/24=24
Média	24,40	26,80	25,33
Desvio	1,55	3,61	2,80
EPM	0,40	0,93	0,72

Tabela 47. Número de estros obtidos da verificação da fase do ciclo estral em 15 dias consecutivos de ratas dos grupos Controle, Isoflavona 10mg/kg e Isoflavona 100mg/kg.

Número de Estros			
Dias	Controle	Isoflavona 10mg/kg	Isoflavona 100mg/kg
1	4	4	4
2	4	4	4
3	3	4	4
4	4	3	4
5	4	3	3
6	4	4	2
7	4	2	4
8	4	3	3
9	4	4	4
10	3	4	4
11	3	3	2
12	3	3	3
13	3	3	4
14	3	3	4
15	3	3	2
Média	3,53	3,33	3,40
Desvio	0,52	0,61	0,82
EPM	0,13	0,15	0,21