

**ELAINE TRAVAGLIA SANTOS**

**EFEITOS DAS ISOFLAVONAS NO NÚMERO DE FIBRAS  
MUSCULARES, VASOS SANGUÍNEOS E FIBRAS COLÁGENAS  
NO ÚTERO E NA URETRA DE RATAS CASTRADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências

São Paulo  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ELAINE TRAVAGLIA SANTOS**

**EFEITOS DAS ISOFLAVONAS NO NÚMERO DE FIBRAS  
MUSCULARES, VASOS SANGUÍNEOS E FIBRAS COLÁGENAS  
NO ÚTERO E NA URETRA DE RATAS CASTRADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências

Orientador:  
Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

Co-orientadores:  
Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões  
Profa. Dra. Marair Gracio Ferreira Sartori

São Paulo  
2008

Santos, Elaine Travaglia

**Efeitos das isoflavonas no número de fibras musculares, vasos sanguíneos e fibras colágenas no útero e na uretra de ratas castradas/ Elaine Travaglia Santos - - São Paulo, 2008.**

xiii, 75f

Tese (mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de pós-graduação em ginecologia.

Título em inglês: Effects of the isoflavones in the number of muscles fibers, blood vessels and collagen fibers in uterus and urethra of ooforectomized rats

1. Isoflavonas 2. uretra/útero 3. fibras musculares 4. vasos sanguíneos 5. fibras colágenas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA**

**CHEFE DE DEPARTAMENTO:  
Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário**

**COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO:  
Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva**

## **Agradecimentos**

A Deus, pela presença constante em todos os momentos da minha vida, sentida de várias maneiras, sobretudo por meio de pessoas maravilhosas que sempre me deram oportunidade, apoio, confiança, força, carinho e amizade.

A meu pai Juracy (in memoriam), por ter estado sempre ao meu lado; por ter me ensinado o significado de bondade, honestidade, força, integridade, educação, ideal e amizade; por ter me lembrado, pouco antes de partir, que sempre se deve concluir o que se começou; por todo o carinho e atenção que sempre dedicou a todos de sua família; por ter me ensinado, pelo seu exemplo próprio, a lutar sempre e a nunca desistir de realizar um sonho; por estar ainda tão presente em minha vida e por esta conquista, que é também sua.

À minha mãe Eliane, com eterno reconhecimento e gratidão, pela luz que sempre foi a minha vida; pelo seu exemplo de generosidade, alegria, meiguice, força e dedicação; por acreditar e torcer por mim; por todo seu estímulo e apoio.

Aos meus irmãos Gustavo e Mariana, com admiração e fraternidade, pelas alegrias que sempre trouxeram a minha vida; pela amizade, pelo companheirismo, carinho e apoio.

Ao meu marido e grande companheiro Sebastião, com todo o meu amor, por sua dedicação, compreensão e apoio incondicional; por estar sempre presente nos momentos mais difíceis e também nos mais felizes.

Ao meu filho Caio, tão importante em minha vida, por ser especial e único, motivo de tantas alegrias, e razão de sempre se ir em frente; com amor e desculpas por todas as horas de ausência do convívio familiar em prol da pesquisa e da ciência.

À minha filha Clara, tão bela e pequenina, que ainda no útero materno já vivenciava todas as emoções envoltas na realização desse trabalho, por ser em minha vida mais uma fonte de alegrias e mais um motivo para prosseguir rumo às conquistas.

À minha avó e a todos os familiares, pelo exemplo de união; por estarem sempre comemorando comigo as conquistas sem, no entanto, se esquecerem de me apoiar nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão, pelo exemplo de profissionalismo, competência e sabedoria; pela imensa generosidade e amizade; por ter acreditado em meu trabalho; pela oportunidade de crescimento e aperfeiçoamento, com todo o meu respeito, minha admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões, pela amizade, compreensão e disponibilidade para ajudar.

À Prof. Dra. Marair Gracio Ferreira Sartori, pelo exemplo de capacidade profissional, pela simpatia, atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Júnior, por sua atenção, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Cecon, da Universidade Federal de Viçosa, pela gentileza em ajudar-me na análise estatística.

Ao pós-graduando de Setor de Uroginecologia da UNIFESP-EPM, Dr. Sérgio Brasileiro Martins, pelo incentivo e pela amizade.

À pós-graduanda do Setor de Uroginecologia da UNIFESP-EPM, Dra. Maria Dione Dutra Sampaio, por sua ajuda na aquisição dos materiais necessários à pesquisa e ao manejo dos animais; pelo otimismo, incentivo e pela amizade.

À pós-graduanda do Departamento de Morfologia da UNIFESP-EPM, Rejane Mosquette, pelo auxílio na manipulação dos animais.

Ao técnico da Disciplina de Histologia da UNIFESP-EPM, Paulo Celso Franco, pela contribuição no processamento histológico do material da pesquisa; pela gentileza, amizade e disponibilidade.

Ao pós-graduando do Departamento de Morfologia da UNIFESP-EPM, Luiz Fernando Portugal Fuchs, pela realização das fotos das lâminas.

Aos funcionários da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia da UNIFESP-EPM, Srs. Ednaldo e Pedro, pela imensa contribuição no cuidado e tratamento dos animais.

À secretária da Pós-graduação da Disciplina de Ginecologia da UNIFESP-EPM, Karin Martin dos Santos, pela disponibilidade em colaborar na parte técnica da pós-graduação, de forma sempre simpática, gentil e atenciosa.

À enfermeira Eliana Suelotto Machado Fonseca e à funcionária Dirce S. Vieira, pela dedicação, presteza em ajudar e pelo empenho no bom funcionamento do Setor de Uroginecologia da UNIFESP-EPM.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, Zélia Maria Gomes Macedo, Maria Cecília da Silva Rocha Santos e Valéria Miranda dos Santos Medina, pela disponibilidade e gentileza.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários da Disciplina de Uroginecologia da UNIFESP-EPM, que sempre me acolheram no serviço e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Lênio de Souza Alvarenga, pelo auxílio na aquisição dos artigos internacionais, apoio e carinho.

Ao meu amigo João Alexandre de Melo Mendonça, pela tradução do resumo, amizade e disponibilidade.

Aos animais que deram suas vidas pela ciência.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa, cuja conquista também lhes pertence.



## Sumário

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos .....                      | iv   |
| Listas .....                              | ix   |
| Resumo .....                              | xiii |
| 1. INTRODUÇÃO .....                       | 01   |
| 1.1 Ações atribuídas às isoflavonas ..... |      |
| 2. PROPOSIÇÃO .....                       | 20   |
| 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....             | 22   |
| 4. RESULTADOS .....                       | 29   |
| 4.1 Resultados morfológicos .....         | 30   |
| 4.2 Resultados morfométricos .....        | 33   |
| 5. DISCUSSÃO .....                        | 37   |
| 6. CONCLUSÕES .....                       | 50   |
| Anexos .....                              | 52   |
| Referências bibliográficas .....          | 56   |
| Abstract .....                            | 74   |
| Bibliografia consultada .....             | 75   |

## Lista de figuras

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1. | Estrutura química das isoflavonas e do 17 $\beta$ -estradiol. Notar a pequena diferença existente na estrutura das isoflavonas (por exemplo: a daidzeína difere da genisteína pela ausência de um grupo hidroxila no anel A). Entretanto, esta diferença estrutural pode diminuir consideravelmente a atividade de uma isoflavona, como no caso da daidzeína. | 07 |
| Figura 2. | Representação esquemática das principais biotransformações no metabolismo das isoflavonas em humanos e animais.   | 09 |
| Figura 3. | Diagrama simplificado, ilustrando a distribuição anatômica dos receptores estrogênicos.   | 11 |
| Figura 4. | Gráfico demonstrativo da média dos pesos relativos uterinos em mg de peso úmido/100g de peso corporal de ratas castradas com e sem administração de genisteína durante 21 dias.   | 25 |
| Figura 5. | Fotomicrografia do útero de rata castrada: (a) aumento de 100X (H.E.); (b) aumento de 400X (H.E.).  | 30 |
| Figura 6. | Fotomicrografia do útero de rata castrada e submetida à terapia precoce com isoflavona: (a) aumento de 100X (H.E.); (b) aumento de 400X (H.E.).   | 31 |
| Figura 7. | Fotomicrografia do útero de rata castrada e submetida à terapia tardia com isoflavona: (a) aumento de 100X (H.E.); (b) aumento de 400X (H.E.).  | 31 |
| Figura 8. | Fotomicrografia da uretra de rata castrada: (a) aumento de 100x (H.E.); e (b) aumento de 400X (H.E.).   | 32 |
| Figura 9. | Fotomicrografia da uretra de rata castrada e submetida à terapia precoce com isoflavonas: (a) aumento de 100x (H.E.); e (b) aumento de 400x (H.E.).   | 32 |

|            |   |          |
|------------|---|----------|
| Figura 10. | Fotomicrografia da uretra de rata castrada e submetida à terapia tardia com isoflavonas: (a) aumento de 100x (H.E.); e (b) aumento de 400x (H.E.).  | ..... 33 |
| Figura 11. | Gráfico demonstrativo da média do número de núcleos, fibras colágenas e vasos no útero de ratas castradas e de ratas tratadas precoce e tardiamente à castração com isoflavonas.  | ..... 34 |
| Figura 12. | Gráfico demonstrativo da média do número de núcleos, fibras colágenas e vasos na uretra de ratas castradas e de ratas tratadas precoce e tardiamente à castração com isoflavonas.   | ..... 35 |
| Figura 13. | Ações genômicas e não-genômicas das isoflavonas nas células. As isoflavonas podem interagir de forma clássica com receptores nucleares estrogênicos, inibindo ou ativando a transcrição de genes celulares específicos. Efeitos não-genômicos dos fitoestrogênios podem incluir inibição de efeitos em outras moléculas como topoisomerase II e tirosino-quinase. | ..... 42 |

## Lista de tabelas

|           |  |          |
|-----------|--|----------|
| Tabela 1. | Conteúdo de isoflavonas de alimentos selecionados.   | ..... 08 |
| Tabela 2. | Médias e desvio-padrão da média do peso corporal dos animais, do peso uterino e do peso relativo do útero (mg tecido úmido/100g de peso corporal) dos animais castrados (Controle) e dos animais castrados e medicados com diferentes doses de genisteína (2,5; 25; 50; 125µg/g de peso corporal/dia). | ..... 26 |
| Tabela 3. | Resumo da análise de variâncias do número de núcleos, vasos e fibras colágenas, na uretra média e no útero, de ratas castradas e tratadas com isoflavonas precoce e tardiamente à castração.   | ..... 34 |
| Tabela 4. | Médias do número de núcleos, vasos e fibras colágenas na uretra média e no útero, de ratas castradas e tratadas com isoflavonas precoce e tardiamente à castração.   | ..... 35 |
| Tabela 5. | Médias do número de núcleos, vasos e fibras colágenas na uretra média e no útero, de ratas castradas e tratadas com isoflavonas precoce e tardiamente à castração.   | ..... 36 |

## Lista de abreviaturas e símbolos

|                    |  |
|--------------------|--|
| TH –               | Terapia hormonal   |
| WHI –              | Women’s Health Initiative  |
| SERMs –            | Moduladores seletivos de receptores de estrogênio  |
| USDA –             | Iowa State University Database   |
| RE $\alpha$ –      | Receptor estrogênico do tipo $\alpha$  |
| RE $\beta$ –       | Receptor estrogênico do tipo $\beta$   |
| SHBG –             | <i>Sex hormone binding globulin</i> – globulina ligante dos hormônios sexuais                                  |
| PC –               | Peso corporal  |
| CAST –             | Grupo castrado (controle)  |
| C –                | Grupo controle (castrado)  |
| ISO5D –            | Grupo tratado com extrato de isoflavonas a partir do 5 <sup>o</sup> dia da castração por 30 dias consecutivos  |
| ISO28D –           | Grupo tratado com extrato de isoflavonas a partir do 28 <sup>o</sup> dia da castração por 30 dias consecutivos |
| HE –               | Coloração hematoxilina eosina  |
| RNA –              | Ácido ribonucléico   |
| RNA <sub>m</sub> – | RNA mensageiro   |
| CR –               | <i>Cimifuga racemosa</i>   |

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o número de fibras musculares, vasos sanguíneos e fibras colágenas na uretra e no útero de ratas adultas castradas, tratadas com extrato de isoflavonas de soja, precoce e tardiamente à castração.

**Métodos:** Foram utilizadas 45 ratas adultas, virgens, pesando em média 200g, *Rattus norvegicus albinus* (Rodentia Mammalia, Wistar EPM-1). Os animais foram alimentados com ração à base de caseína, isenta de soja. Após cinco dias de adaptação, as ratas foram anestesiadas e submetidas à ooforectomia bilateral. Após cinco dias da castração, foram divididas em três grupos de 15 ratas cada: Grupo I - (controle) – castradas sem tratamento, que receberam somente o veículo propilenoglicol durante 30 dias consecutivos, sendo sacrificadas a seguir; Grupo II (ISO5D) - ratas tratadas com isoflavonas na dose de genisteína de 125 µg/g peso corporal por dia, a partir do 5<sup>o</sup> dia da castração, por 30 dias consecutivos; Grupo III (ISO28D) - ratas tratadas com isoflavonas na dose de genisteína de 125 µg/g peso corporal por dia, a partir do 28<sup>o</sup> dia da castração, por 30 dias consecutivos. Após os trinta dias de tratamento, as ratas foram sacrificadas. Utilizou-se extrato de isoflavonas a 40%, contendo 8,15% de genisteína e 19,19% de daidzeína, administrado aos animais por gavagem. Foi realizado um estudo prévio para a padronização da dose do extrato, avaliando-se o efeito no peso relativo do útero em diferentes doses de genisteína (2,5; 25; 50; 125µg/g PC/ dia), usando-se um controle negativo para comparação. Após o sacrifício, realizou-se estudo morfométrico das paredes do útero e da uretra média das ratas, por meio de contagem do número de núcleos, vasos sanguíneos e fibras colágenas.

**Resultados:** Em relação ao útero, observa-se que os grupos tratados precoce e tardiamente com isoflavonas diferiram do grupo controle em todas as características. Em se tratando da uretra, nota-se que apenas o grupo tratado precocemente com isoflavonas diferiu do grupo controle nas características número de núcleos e de fibras colágenas. Comparando-se os grupos tratados precoce e tardiamente com isoflavonas, observa-se que não há diferença entre eles para todas as características, em relação ao útero. Analisando-se a uretra, houve diferença entre os grupos tratados para as características número de núcleos e de fibras colágenas.

**Conclusão:** Os achados mostraram que a administração oral de extrato de isoflavonas da soja para ratas adultas ooforectomizadas, na dose de genisteína de 125µg/ g de peso corporal/ dia apresenta efeito uterotrópico. A administração do extrato precoce à ooforectomia tem efeito em uretra média, revertendo às alterações advindas da castração, o que não se observa com a administração do extrato após 28 dias da ooforectomia.

## **INTRODUÇÃO**

A população mundial encontra-se em acelerado processo de envelhecimento <sup>(1)</sup>. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <sup>(2)</sup> apontam que, em 1950, havia cerca de 204 milhões de idosos no mundo e, já em 1998, quase cinco décadas depois, esse contingente alcançava 579 milhões de pessoas, o que equivale a um crescimento de quase 08 milhões de pessoas idosas por ano. Estima-se que exista, neste início do terceiro milênio, ao redor de 700 milhões de mulheres no mundo com mais de 50 anos de idade <sup>(1)</sup>. Uma das explicações para esse fenômeno é o aumento, verificado desde 1950, de 19 anos na esperança de vida ao nascer em todo o mundo <sup>(2)</sup>.

A média mundial de vida ao nascer, que era de 65 anos em 2000, deverá atingir os 74,3 anos entre 2045 e 2050 <sup>(3)</sup>. Na Venezuela, as mulheres com 45 anos ou mais de idade representam 9,4% da população geral, o que significa 2,2 milhões de pessoas, sendo a expectativa de vida dessas mulheres de 74,7 anos de idade <sup>(1)</sup>.

No Brasil, os avanços da medicina e a melhoria nas condições gerais de vida da população contribuíram para elevar a expectativa de vida dos brasileiros, que aumentou 17 anos entre 1940 e 1980, passando de 45,5 para 62,6 anos, respectivamente. Em 2000, esse indicador chegou aos 70,4 anos, e deverá atingir os 81,3 anos em 2050 <sup>(3)</sup>.

A queda combinada das taxas de fecundidade e mortalidade vem ocasionando uma mudança na estrutura etária, com a diminuição relativa da população mais jovem e o aumento proporcional dos idosos. Em 2000, 30% dos brasileiros tinham de zero a 14 anos, e os maiores de 65 representavam 5% da população. Em 2050, esses dois grupos etários se igualarão: cada um deles representará 18% da população brasileira. Se em 2000 o Brasil tinha 1,8 milhões de pessoas com 80 anos ou mais, em 2050 esse contingente poderá ser de 13,7 milhões <sup>(3)</sup>.

As proporções entre a população masculina e feminina vêm-se alterando paulatinamente no Brasil. O excedente feminino, que era de 2,5 milhões em 2000, chegará a seis milhões em 2050. Já a diferença entre a esperança de vida de homens e mulheres atingiu 7,6 anos em 2000 – sendo a masculina de 66,71 anos e a feminina de 74,29 anos <sup>(3)</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS <sup>(4)</sup> as japonesas são as mulheres com a maior expectativa de vida - 86 anos. A expectativa de vida saudável dessas mulheres é de 78 anos. Nos Estados Unidos, a expectativa de vida e a expectativa de vida saudável das mulheres são de 80 e 71 anos, respectivamente, enquanto no Brasil é de 75 e 62 anos <sup>(4)</sup>.



Com o aumento na expectativa de vida no último século, mais mulheres passam uma parte importante da vida na pós-menopausa <sup>(5)</sup>, expondo-se mais às conseqüências deletérias do hipoestrogenismo <sup>(6-7)</sup>. Conseqüentemente, enfrentam também o aumento da prevalência de doenças crônicas relacionadas com a idade <sup>(8)</sup>, tais como osteoporose, doença de Alzheimer, câncer de mama, câncer de endométrio e doenças cardiovasculares, todas diretamente relacionadas com as alterações estrogênicas <sup>(1)</sup>.

Menopausa é a data da última menstruação e significa cessação permanente da função ovariana, por falência gonadal, e final do potencial reprodutivo da mulher <sup>(9-11)</sup>. Caracteriza-se por deficiência de hormônios esteróides, com rápida e progressiva redução dos níveis séricos de estradiol.

A idade média da menopausa espontânea ocorre entre 50 e 52 anos nos países desenvolvidos e um a dois anos antes nos países em desenvolvimento. Vários fatores são associados à alteração da idade da menopausa; entre eles, o que parece ter papel mais claramente definido é o fumo, provocando antecipação dessa idade <sup>(12)</sup>.

Os estrogênios, em especial o estradiol, promovem as características femininas, controle dos ciclos reprodutivos e da gravidez; influenciam pele, ossos, sistema cardiovascular e imunidade. Os estrogênios naturais têm, em geral, meia-vida curta, não se acumulam nos tecidos, são facilmente metabolizados no fígado e são mais potentes que a maioria dos estrogênios sintéticos conhecidos <sup>(13)</sup>.

O hipoestrogenismo pode causar diversos distúrbios como sintomas vasomotores, doenças cardiovasculares, osteoporose, alterações urogenitais, distúrbios cognitivos, perda de massa óssea, sintomas vaginais e vesicais, entre outros <sup>(10, 11, 14, 15)</sup>. Também o sistema imune pode ser comprometido depois da menopausa pelos efeitos da idade e da diminuição das concentrações de estrogênio, considerado um imunomodulador <sup>(16)</sup>.

A síndrome do climatério ou transição menopausal caracteriza-se por alterações metabólicas, atróficas e clínicas, genitais e extragenitais <sup>(17)</sup>. Representa uma fase da vida em que as mulheres sofrem de transformações físicas, emocionais e hormonais, que podem ter implicações negativas na qualidade de suas vidas. Os sintomas vasomotores mais freqüentes incluem ondas de calor, suores noturnos, palpitações e cefaléia. Também podem ocorrer sintomas psicológicos, entre eles, depressão, irritabilidade, fadiga e perda de libido <sup>(18)</sup>.

Aproximadamente dois terços das mulheres que atingem a menopausa desenvolvem sintomas, primariamente fogachos <sup>(19)</sup>, sendo que as obesas tendem a sofrer mais frequentemente e mais severamente, apesar do maior nível residual estrogênico pela conversão periférica dos androgênios da supra-renal no tecido adiposo <sup>(20)</sup>. Algumas estatísticas chegam a 83% de mulheres sintomáticas, com deterioração importante na qualidade de vida <sup>(1)</sup>.

A deprivação estrínica da pós-menopausa acarreta diversos sinais e sintomas urogenitais, destacando-se secura vaginal, dispareunia, prurido vulvar, leucorréia, urgência miccional e incontinência urinária <sup>(21-22)</sup>.

Os sintomas vasomotores aparecem mais precocemente, e, com o agravamento da deficiência estrogênica, sobrevêm alterações na pele, nas mamas, nos sistemas neuropsíquico, cardiovascular e genito-urinário, no metabolismo ósseo e no sono <sup>(5)</sup>.

Estudos mostram que as mulheres orientais sofrem menos com os sintomas da pós-menopausa que as mulheres ocidentais. Apesar das diferenças culturais, esse fato pode ser atribuído ao alto teor de fitoestrógenos em suas dietas <sup>(14)</sup>.

Estima-se que apenas 27% das mulheres ocidentais sofrem com fogachos e 24% relatam sudorese noturna <sup>(23-24)</sup>, enquanto, entre as ocidentais 85% experimentam sintomas vasomotores <sup>(25)</sup>.

A terapia hormonal (TH) mostrou-se eficaz para prevenção e tratamento do climatério e suas repercussões <sup>(15, 26)</sup>. O início dos sintomas climatéricos (fogachos e suores noturnos) constitui a principal razão para as mulheres na perimenopausa iniciarem a terapia hormonal <sup>(27)</sup>. Contudo, estima-se que entre 20% e 50% das mulheres que iniciam a TH interrompem o tratamento depois de poucos meses, ou por causa dos efeitos colaterais, ou por medo das complicações a longo prazo <sup>(25)</sup>. Os efeitos adversos da TH e os riscos a ela associados instigam avaliar novas opções de tratamento <sup>(26)</sup>.

Cada vez mais as mulheres de meia idade vêm buscando meios para a promoção de sua saúde. A terapia hormonal tem sido considerada o tratamento de primeira escolha e o mais efetivo para os sintomas vasomotores e urogenitais, relacionados à deficiência estrogênica <sup>(28)</sup>. Entretanto, após o resultado do estudo WHI (Women's Health Initiative) muitas delas deixaram de ver esse tratamento como primeira opção. Como resultado, tem havido interesse crescente em alternativas naturais ao tratamento com hormônios, voltando-se para a botânica e suplementos

dietéticos <sup>(29)</sup>. Soma-se, também, o fato de que muitas mulheres apresentam contra-indicação à TH <sup>(30)</sup> e outras não estão dispostas a usá-la, mas querem uma opção para alívio dos sintomas e prevenção de doenças crônicas.

A baixa incidência de sintomas climatéricos nas mulheres asiáticas, que ingerem altas quantidades de soja, sugere que os fitoestrógenos são uma alternativa à estrogenerioterapia convencional <sup>(27)</sup>.

Estudos epidemiológicos constataram que os orientais, consumidores regulares de grande quantidade de fitoestrogênios, particularmente as isoflavonas da soja, raramente têm doenças frequentes nos ocidentais, tais como câncer de mama, doenças cardiovasculares, câncer de endométrio, sintomas de hipoestrogenismo na mulher na pós-menopausa, osteoporose e câncer de intestino <sup>(31-39)</sup>.

A incidência de fraturas e osteoporose difere entre mulheres brancas orientais e ocidentais. Isto pode depender, pelo menos em parte, de fatores nutricionais, incluindo variações no consumo de fitoestrógenos <sup>(32)</sup>.

Isoflavonas como a genisteína e daidzeína, encontradas em grande quantidade na soja, são responsabilizadas pelos efeitos positivos na saúde, sendo capazes de exercer efeito estrogênico, antiestrogênico, antiviral e antiproliferativo <sup>(40)</sup>.

Constatou-se que as isoflavonas podem ajudar a prevenir a carcinogênese hormonal pela diminuição dos metabólitos estrogênicos genotóxicos <sup>(41)</sup> e que os fitoestrógenos são benéficos para a hiperlipidemia após a menopausa <sup>(42)</sup> e para os fogachos <sup>(43)</sup>.

Acrescem-se a esses os estudos *in vitro* demonstrando que os fitoestrógenos possuem atividade anticarcinogênica <sup>(44)</sup>, antioxidante <sup>(45)</sup>, antiproliferativa <sup>(46)</sup> e antiangiogênica <sup>(47)</sup>.

As pacientes na peri e pós-menopausa estão entre os maiores consumidores dos fitoterápicos e suplementos dietéticos, apesar de 70% das mulheres não relatarem o uso aos seus médicos <sup>(19)</sup>. Estima-se que aproximadamente 25% das mulheres climatéricas sintomáticas recorram à fitoterapia <sup>(48)</sup>. Nos Estados Unidos, as estatísticas de 2000 apontam para um índice de 50% de usuárias regulares de suplementos dietéticos, o que representa um gasto anual de 20 bilhões de dólares <sup>(49)</sup>.

Apesar de haver limitada evidência científica sobre a eficácia e segurança a longo prazo desses produtos, muitas mulheres consideram os tratamentos alternativos naturais atraentes <sup>(19)</sup>.

Os fitoestrogênios podem apresentar vantagens em relação à TH, à medida que podem reduzir o LDL colesterol sem induzir hipertrigliceridemia; aliviar sintomas relacionados ao climatério sem aumentar o risco de neoplasias uterinas e mamárias, melhorar a função vascular sem acelerar angiogênese patológica e pelo fato de não haver relatos de eventos trombóticos ou outros efeitos adversos nessa modalidade de tratamento <sup>(33)</sup>.

A soja tem sido o maior componente das dietas de várias populações asiáticas por séculos. Portanto, isoflavonas como a genisteína têm sido extensamente consumidas sem nenhum aparente efeito adverso <sup>(50)</sup>.

A atividade estrogênica das plantas foi primeiramente identificada em 1926, e, em meados da década de 70, já se tinha demonstrado que centenas de plantas exibiam atividade estrogênica. Os fitoestrógenos assumiram importância biológica e econômica nos anos 40, quando substâncias estrogênicas nas plantas foram descritas como causadoras de desordens reprodutivas em ovelhas alimentadas com trevos subterrâneos na Austrália <sup>(51)</sup>, na chamada “Doença do Trevo”.

A falha no sistema reprodutivo de ovelhas que se alimentavam de pastagens estrogênicas tem sido atribuída aos efeitos dos fitoestrógenos em útero e cérvix <sup>(51)</sup>. Esses efeitos incluem espessamento e queratinização do epitélio vaginal, aumento da cérvix, aumento do peso uterino e hiperplasia endometrial <sup>(52-53)</sup>.

Os fitoestrógenos são compostos não esteróides, que ocorrem naturalmente em plantas e contêm um grupo fenólico posicionado semelhantemente aos estrógenos <sup>(54)</sup>. A distância entre os grupos hidroxila presos a essas moléculas é semelhante e essencial para se ligar aos receptores estrogênicos <sup>(55)</sup>. São considerados moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs) naturais, com atividade estrogênica e antiestrogênica <sup>(56-57)</sup>.

Há cerca de 20 tipos, identificados a partir de 300 plantas de 16 famílias, que podem ser agrupados em classes: as isoflavonas, os coumestanos, os lignanos e os micoestrógenos <sup>(58)</sup>.

As isoflavonas são compostos difenólicos pertencentes a uma subfamília dos flavonóides. As principais isoflavonas são genisteína, daidzeína e gliciteína, podendo ser encontradas nas

formas não-conjugada (aglicona), conjugada (glicosilada), acetilglicosilada e malonilglicosilada (58).

As isoflavonas, os fitoestrógenos mais comuns na dieta humana, estão presentes principalmente em produtos à base de soja, mas também em outros grãos como na ervilha verde, lentilha, no feijão e seus derivados e em legumes (59). Os lignanos são encontrados nos grãos integrais, legumes, vegetais e nas sementes, principalmente no linho. Grãos oleosos como a linhaça contêm as maiores concentrações de lignanos (60). Os principais lignanos biologicamente ativos são o enterodiol e enterolactona. Os coumestanos estão presentes em brotos de feijão, soja e alfafa (61). O principal deles é o coumestrol.

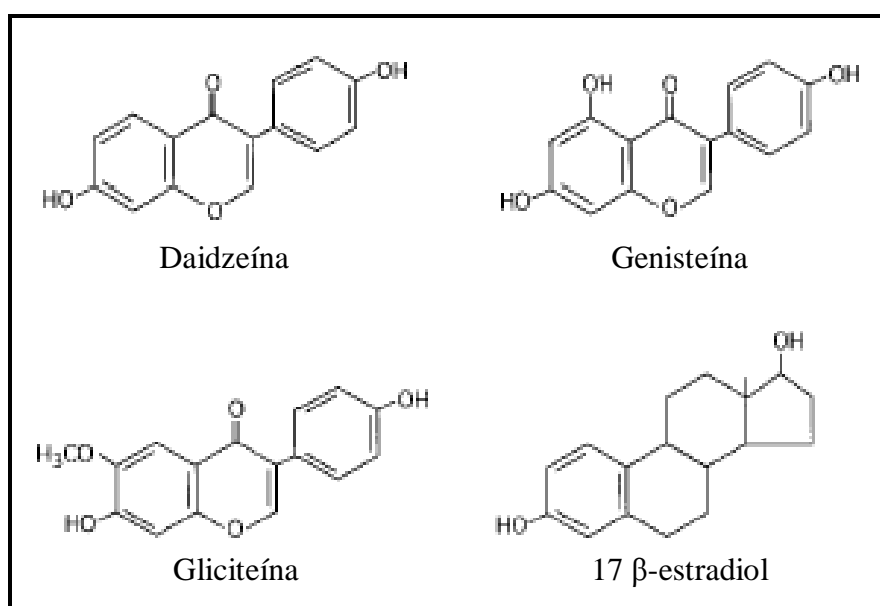


Figura 1 - Estrutura química das isoflavonas e do 17 $\beta$ -estradiol. Nota-se a pequena diferença existente na estrutura das isoflavonas (por exemplo: a daidzeína difere da genisteína pela ausência de um grupo hidroxila no anel A). Entretanto, esta diferença estrutural pode diminuir consideravelmente a atividade de uma isoflavona, como no caso da daidzeína.

Fonte: Adaptado de Anderson et al, 1999 (62).

A quantidade de isoflavonas presente nos alimentos é muito variável. A tabela 1 mostra o conteúdo de isoflavonas em alguns alimentos selecionados <sup>(63)</sup>.

Tabela 1 – Conteúdo de isoflavonas de alimentos selecionados

| <b>Alimento</b>                         | <b>Isoflavonas (mg/100g)</b> |
|---|------------------------------|
| Semente de soja tostada                 | 128,4                        |
| Semente de soja fervida sem sal         | 54,7                         |
| Tempeh cozido (bolo de soja fermentado) | 53,0                         |
| Queijo de soja                          | 31,3                         |
| Tofu                                    | 16,3 a 29,2                  |
| Salsicha de soja congelada, crua        | 15,0                         |
| Nugget de galinha, sem carne            | 14,6                         |
| Semente de soja verde cozida sem sal    | 13,8                         |
| Bacon, sem carne                        | 12,1                         |
| Leite de soja                           | 9,7                          |
| Talharim de soja                        | 8,5                          |
| Cereal de soja                          | 3,8                          |
| Fórmulas infantis                       | 7,0 a 24,0                   |

**Fonte:** USDA – “Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods”, 1999 <sup>(63)</sup>.

Dentre as isoflavonas, os principais compostos são formados por genisteína, daidzeína, biochanina A e formononetina <sup>(64-65)</sup>. Essas substâncias são absorvidas no intestino, com metabolização hepática e excreção, principalmente renal. Pequena parte dessas substâncias é eliminada pela vesícula biliar e pelo intestino <sup>(66-67)</sup>.

A genisteína é o mais abundante e mais ativo fitoestrógeno da soja <sup>(68)</sup>. A genisteína e a daidzeína são encontradas, principalmente, nas suas formas inativas ou precursoras, e são hidrolisadas para a forma ativa no trato gastrointestinal. Uma porção da população também metaboliza a daidzeína para uma forma mais ativa biologicamente, o equol; porém, muitos indivíduos não são capazes de realizar essa conversão <sup>(69-70)</sup>.

As agliconas, formas biologicamente ativas, são absorvidas mais rapidamente e em quantidades maiores do que os glicosídeos (formas glicosiladas) em seres humanos. A concentração plasmática após ingestão de agliconas é duas a três vezes maior que após a de glicosídeos e, após duas a quatro semanas, ainda permanece 100% mais alta do que a concentração de glicosídeos. Após a conversão em aglicona, cerca de 1/3 é absorvido como isoflavona livre e os 2/3 restantes são fermentados por bactérias e transformados em metabólitos, tais como equol, e então absorvidos <sup>(64)</sup>.

Depois da ingestão oral, os glicosídeos são hidrolisados pelas bactérias do intestino grosso e absorvidos. As agliconas são glucuronizadas e sulfatadas no fígado, caem na recirculação êntero-hepática e são excretadas primariamente na urina <sup>(71)</sup>.

### Metabolismo das isoflavonas da soja em humanos

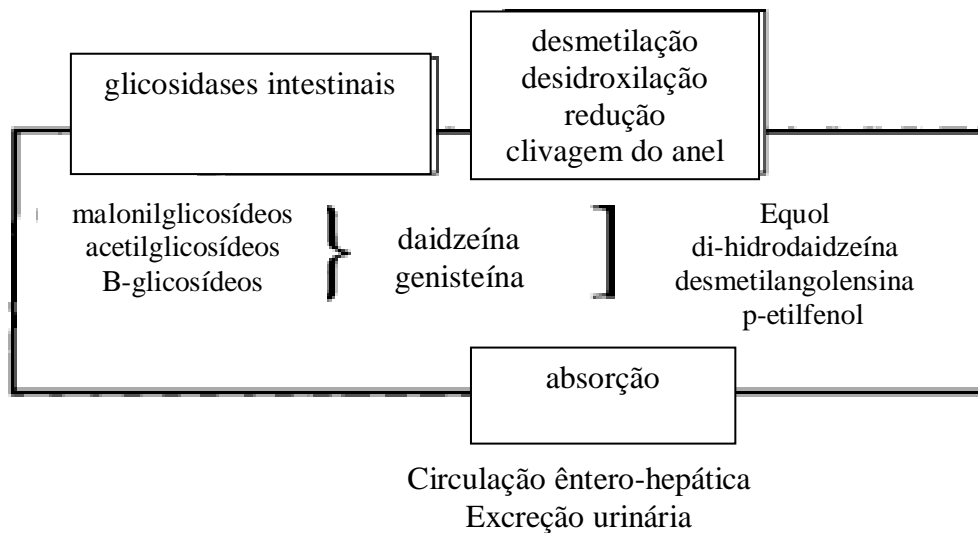


Figura 2 – Representação esquemática das principais biotransformações no metabolismo das isoflavonas em humanos e animais.

Fonte: Adaptado de Setchell e Cassidy, 1999 <sup>(72)</sup>.

Os fitoestrogênios, como isoflavonas e lignanos, são mais estáveis que os estrogênios endógenos como o estradiol, e têm uma meia-vida maior. Por causa da característica lipofílica, tendem a acumular-se na gordura e nos tecidos <sup>(13)</sup>.

Sabe-se que a conformação do receptor é determinada pela natureza do ligante. Em 1986, Greene e colaboradores <sup>(73)</sup> descobriram o receptor estrogênico. Dez anos mais tarde, Kuiper e colaboradores <sup>(74)</sup> descobriram o receptor estrogênico tipo  $\beta$ . A existência de dois tipos de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$  sugere que a afinidade diferente dos ligantes, para cada um desses receptores, associada às diferenças teciduais específicas na sua síntese, possa explicar vários aspectos da seletividade dos SERMs, tais como tamoxifeno, raloxifeno, idoxifeno e isoflavonas <sup>(75)</sup>.

A variação na resposta fisiológica dos fitoestrógenos é tecido-específica e depende do número de receptores, do tamanho das proteínas ligantes, da distribuição dos subtipos de receptores e das concentrações de estrogênios <sup>(76)</sup>, bem como da concentração dos mesmos.

A estrutura química das isoflavonas assemelha-se à do 17 $\beta$ -estradiol. Elas têm a maior atividade estrogênica em comparação aos outros fitoestrógenos, apesar de serem 500 a 1.000 vezes mais fracas do que os estrogênios endógenos <sup>(77)</sup>.

Estudos *in vitro* determinaram o efeito estrogênico relativo dos fitoestrógenos. A potência estrogênica comparada ao estradiol (100) desses compostos é: 0,202 para o coumestrol; 0,084 para a genisteína; 0,061 para o equol; 0,013 para a daidzeína; -0,006 para a biochanina A e -0,0006 para a formononetina <sup>(78)</sup>.

Entretanto, numa população que ingere grandes quantidades de legumes, elas podem estar presentes em níveis acima de 1.000 vezes os de estrogênios <sup>(79)</sup>. Ou seja, o mesmo nível de bioatividade pode ser produzido pelas isoflavonas e pelo estradiol, desde que haja concentrações suficientemente altas para obterem-se máximas respostas <sup>(78)</sup>.

O consumo estimado de isoflavonas nos países asiáticos, como a China, é de 20 a 80 mg/dia <sup>(80)</sup>. Nas mulheres americanas na pós-menopausa, está abaixo de 01 mg/dia <sup>(81)</sup>. A população brasileira tradicionalmente não consome soja. O óleo de soja, que está presente sobremaneira na dieta brasileira, não contém isoflavonas.

As isoflavonas ligam-se com maior afinidade aos receptores estrogênicos do tipo  $\beta$  (RE $\beta$ ) em relação aos receptores estrogênicos do tipo  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) <sup>(27)</sup>. Já os estrógenos apresentam maior afinidade pelos receptores tipo  $\alpha$  <sup>(82)</sup>. A maior afinidade ao receptor ER $\beta$  sugere que as isoflavonas possam exercer efeitos seletivos estrogênico e antiestrogênico, dependendo do tecido e da concentração das mesmas. Elas ligam-se aos receptores estrogênicos distribuídos principalmente nos ossos, no cérebro, endotélio vascular e na bexiga <sup>(83)</sup>. As isoflavonas são mais seletivas para os receptores ER $\beta$  na proporção de 1/20 para o  $\alpha$  e 1/3 para o  $\beta$  <sup>(84)</sup>.

Por causa da preferência em ligar-se aos receptores estrogênicos do tipo  $\beta$ , as isoflavonas expressam atividade estrogênica no sistema nervoso central, nos vasos sanguíneos, no osso e na pele, sem causar estímulo na mama ou no útero <sup>(85)</sup>.



Já o estradiol de mamíferos apresenta maior afinidade com receptores estrogênicos tipo  $\alpha$ , presentes no tecido mamário e uterino <sup>(82)</sup>.

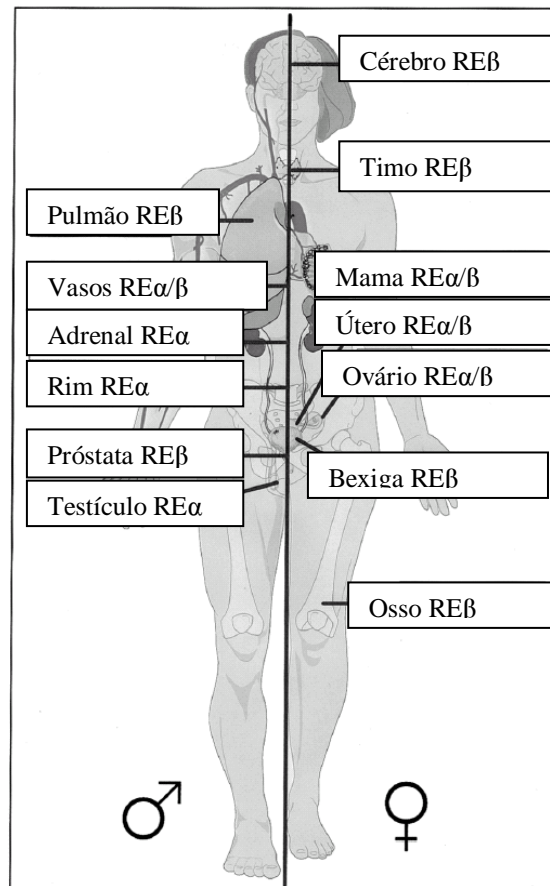


Figura 3 – Diagrama simplificado ilustrando a distribuição anatômica dos receptores estrogênicos.

Fonte: Adaptado de Setchell e Cassidy, 1999 <sup>(72)</sup>.

Entretanto, Morito et al <sup>(86)</sup> investigaram a atividade estrogênica dos derivados das isoflavonas em receptores estrogênicos humanos e verificaram que a genisteína ligou-se e induziu transcrição em ambos os receptores, em maior proporção que as demais isoflavonas. O coumestrol ligou-se, de forma semelhante ao 17 beta-estradiol, aos dois receptores e induziu transcrição de forma semelhante à genisteína. A biochanina-A ligou-se bem ao receptor beta, mas induziu discreta transcrição agindo como antagonista do 17 beta-estradiol.

## 1.1 Ações atribuídas às isoflavonas

### 1.1.1 Sistema cardiovascular

A oxidação dos lipídios tem sido implicada na fisiopatologia da aterosclerose. Alguns estudos sugerem um papel da isoflavona na prevenção da peroxidação dos lipídios<sup>(87)</sup>. Porém, na literatura, observam-se resultados divergentes em experimentos conduzidos em animais e humanos.

Baum et al<sup>(88)</sup> mostraram que proteínas da soja contendo 56 a 90 mg de isoflavonas aumentaram HDL-colesterol, mas não modificaram o colesterol total em mulheres na pós-menopausa com hipercolesterolemia.

Crouse et al<sup>(89)</sup> constataram que, após dieta experimental contendo 62 mg de isoflavonas de proteínas da soja durante 09 semanas, houve significativa queda dos níveis de LDL-colesterol em voluntários levemente hipercolesterolêmicos, o que não ocorreu com dietas contendo 03 mg de isoflavonas de soja.

Nestel et al<sup>(90)</sup>, estudando mulheres na pós-menopausa que consumiram isoflavonas do trevo vermelho na dose inicial de 40 mg/ dia, seguindo-se 80 mg/dia, notaram aumento da elasticidade arterial e melhora cardiovascular, sem alterar os lipídeos plasmáticos.

Merz-Demlow et al<sup>(91)</sup>, estudando mulheres normocolesterolêmicas na pré-menopausa que se submeteram a dietas contendo 129 mg/dia de isoflavonas de soja, verificaram melhora significativa do perfil lipídico.

Teede et al<sup>(92)</sup>, avaliando 179 pessoas saudáveis que consumiram proteínas da soja contendo 118 mg de isoflavonas, mostraram redução significativa nos níveis pressóricos, bem como redução na taxa de LDL/HDL colesterol e nos níveis de triglicérides, mas não verificaram melhora da função vascular.

Van der Schouw et al<sup>(93)</sup>, em estudo prospectivo, descreveram o papel protetor dos fitoestrogênios no risco de aterosclerose e de degeneração arterial pelo efeito na parede das artérias, principalmente em mulheres mais velhas.

Estudos mais recentes comprovam que exercícios físicos e isoflavonas têm efeitos somatórios no metabolismo lipídico e no osso de animais com deficiência estrogênica. A administração diária de 75 mg de conjugado de isoflavonas combinada com exercício físico mostrou efeito favorável no perfil lipídico e na composição corpórea de mulheres na pós-menopausa <sup>(94)</sup>.

Entretanto, vários estudos, usando suplementos de isoflavonas isolados (sem a proteína da soja associada) não mostraram efeitos benéficos no metabolismo lipídico <sup>(90, 95-98)</sup>.

Também, Törmälä et al <sup>(99)</sup> concluíram que o tratamento com isoflavonas não promoveu benefício vascular pela melhora do efluxo de colesterol sérico em mulheres na pós-menopausa.

### **1.1.2 Fogachos**

Lock <sup>(100)</sup> observou que mulheres asiáticas sofrem menos com fogachos do que as mulheres dos países ocidentais.

Vários estudos evidenciam que o consumo de derivados da soja reduz os sintomas de fogachos nas mulheres na pós-menopausa <sup>(97, 101, 102)</sup>. Pode-se constatar, por esses estudos, que há algum benefício no consumo da soja e derivados para reduzir os sintomas do hipoestrogenismo <sup>(62, 103)</sup>.

Cheng et al <sup>(27)</sup> observaram, em estudo prospectivo duplo cego, redução importante dos fogachos e suores noturnos nas mulheres que consumiram 60 mg de isoflavonas diariamente, por um período de três meses. O tratamento não afetou a expressão de receptores estrogênicos do tipo alfa e beta, de progesterona A e B, nem a proliferação do marcador Ki67 no endométrio e na mama <sup>(27)</sup>.

Outros estudos, contudo, indicam um efeito mínimo sobre fogachos, com redução de 45% *versus* 30% com placebo <sup>(102)</sup>, enquanto a TH convencional os reduz em 70% <sup>(104)</sup>.

### **1.1.3 Mucosa vaginal**

Murkies et al <sup>(61)</sup> tentaram provar alguma ação estrogênica dos fitoestrógenos sobre mucosa vaginal e não encontraram qualquer alteração na citologia vaginal estudada, após quatro semanas de uso dos mesmos. Outros autores observaram aumento não-significativo do percentual de células superficiais na citologia vaginal, sem redução dos níveis de FSH e LH ou aumento da SHBG (*sex hormone binding globulin*) <sup>(105)</sup>.

### **1.1.4 Pele**

As mulheres na pós-menopausa queixam-se frequentemente das alterações que ocorrem na pele, que se torna fina, ressecada e sem elasticidade. Essas alterações são decorrentes, além do hipoestrogenismo, da própria idade e também do nível de exposição ao sol. As ações das isoflavonas parecem ser benéficas, por sua ação antioxidante, diminuindo radicais livres e inibindo os danos provocados pelos raios ultravioletas, mas jamais como substitutas das ações tróficas dos estrogênios <sup>(106-107)</sup>.

### **1.1.5 Função cognitiva**

Casini et al <sup>(108)</sup> verificaram que a administração de 60 mg diárias de isoflavonas, durante seis meses, pode ter efeitos positivos nas mulheres na pós-menopausa, melhorando a função cognitiva e o humor das mesmas.

Kritz-Silverstein et al <sup>(109)</sup> notaram efeitos favoráveis na função cognitiva, particularmente na memória verbal, de mulheres na pós-menopausa tratadas com extrato de isoflavonas.

### **1.1.6 Osteoporose**

Evidências acumulam-se no sentido de indicar que o consumo de fitoestrógenos, na peri e pós-menopausa, pode ajudar a prevenir osteoporose <sup>(57)</sup>.

Estudos com ratas ooforectomizadas, submetidas a dietas à base de proteínas da soja e isoflavonas isoladas, têm mostrado prevenção na perda de massa óssea <sup>(110-111)</sup>.

Potter et al <sup>(112)</sup> constataram que mulheres na pós-menopausa, que se submeteram à dieta com proteínas de soja contendo 80 mg/ dia de isoflavonas, apresentaram aumento de massa óssea de coluna lombar.

Alekel et al <sup>(113)</sup> observaram que, na perimenopausa, as isoflavonas da soja atenuaram a perda de massa óssea em coluna lombar.

Mulheres na pré e pós-menopausa que consumiram 80,4 mg/ dia de isoflavonas durante 24 semanas tiveram atenuação da perda óssea <sup>(114)</sup>.

### **1.1.7 Mama**

Adlercreutz et al <sup>(115)</sup> verificaram que mulheres japonesas têm concentrações mais elevadas de fitoestrógenos na corrente sanguínea e na urina e apresentam menor risco para o câncer de mama, comparadas às mulheres do ocidente.

Ingram et al <sup>(116)</sup> verificaram que a maior excreção do equol e da enterolactona associa-se a um risco substancialmente menor de câncer de mama, comparando-se com mulheres com câncer de mama recém-diagnosticado e pacientes-controle.

Também em pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama, Murkies et al <sup>(117)</sup> observaram que os níveis de daidzeína urinários são significativamente menores quando comparados aos controles saudáveis, e que há também tendência a menor excreção urinária de genisteína.

Entretanto, nem todos os estudos mostram evidências convincentes da relação entre exposição aos fitoestrógenos e redução do risco de câncer de mama <sup>(57)</sup>.

### **1.1.8 Sistema imunológico**

O sistema imune também pode ser comprometido pelos efeitos da idade e da diminuição das concentrações de estrogênio, considerado um hormônio imuno-modulador. As isoflavonas,

pelas suas propriedades estrogênicas e antioxidantes, podem oferecer benefícios imunológicos para as mulheres neste estágio da vida. Ryan-Borchers et al <sup>(16)</sup>, em estudo duplo-cego randomizado controlado, em mulheres na pós-menopausa, concluíram que o leite de soja e os suplementos à base de isoflavonas modulam as populações de linfócitos B e parecem proteger contra danos no DNA.

### **1.1.9 Incontinência Urinária**

O declínio na produção estrogênica depois da menopausa contribui para a incontinência urinária, particularmente a incontinência urinária de esforço <sup>(118)</sup>. Na pós-menopausa, os distúrbios urogenitais decorrem, provavelmente, da combinação do envelhecimento fisiológico dos tecidos com o hipoestrogenismo crônico <sup>(119)</sup>.

Vários fatores são relevantes para a manutenção da continência urinária. A integridade anatômica e adequada inervação do sistema esfinteriano uretral, da uretra proximal e da junção uretrovesical são importantes fatores de continência urinária. A manutenção da pressão intra-uretral maior que a vesical, determinada pela mucosa (espessura e pregueamento adequados), vascularização e musculatura uretral, além do tecido conjuntivo peri-uretral, é fundamental para a continência urinária. Todos esses fatores determinantes da pressão intra-uretral são importantes na manutenção das paredes uretrais colabadas e bastante influenciados pelos estrogênios. Estes atuam via receptores estrogênicos existentes no trato urinário baixo e na musculatura pélvica. Na musculatura peri-uretral, promovem aumento do número e da sensibilidade dos receptores alfa-adrenérgicos <sup>(120-131)</sup>.

O uso da terapia hormonal para melhora da incontinência urinária fundamenta-se na embriologia do trato genito-urinário, uma vez que este se desenvolve a partir de um precursor embriológico comum com a genitália feminina, o seio urogenital. Isso pressupõe sensibilidade à ação hormonal do trato urinário, de forma semelhante ao genital <sup>(132)</sup>. Outro indício da ação dos esteróides sexuais é a presença de receptores de estradiol e progesterona na bexiga, uretra, ligamentos, fâscias e musculatura do assoalho pélvico <sup>(122, 125, 127-129, 133-139)</sup>.

Os efeitos do déficit hormonal assumem relevância ao envolverem vários elementos responsáveis pela continência urinária tais como a mucosa uretral, os receptores alfa-

adrenérgicos da uretra, o colágeno e os músculos do assoalho pélvico e a vascularização peri-uretral.

Queixas urinárias comumente ocorrem após a menopausa, entre elas disúria, perda urinária aos esforços, urgência miccional, polaciúria, noctúria, enurese noturna e esvaziamento vesical incompleto. Os distúrbios mais frequentes são: infecção do trato urinário, hiperatividade do detrusor e incontinência urinária de esforço <sup>(140)</sup>.

Os distúrbios do trato urinário na pós-menopausa têm importância por sua alta incidência e pela influência negativa na qualidade de vida dessas mulheres <sup>(141)</sup>.

A incontinência urinária é um dos principais problemas que afligem as mulheres na pós-menopausa <sup>(142)</sup> e é uma das afecções mais frequentes nos serviços de ginecologia <sup>(143)</sup>. Afeta aproximadamente 63,5% das mulheres nesse período da vida <sup>(144)</sup>.

A incontinência urinária é definida como toda perda involuntária de urina. Para o diagnóstico, devem-se afastar infecções ou outras enfermidades locais <sup>(145)</sup>.

A incontinência urinária de esforço é definida como perda de urina sincrônica ao esforço, tais como espirro ou tosse <sup>(145)</sup>.

A incontinência urinária de urgência é a queixa de perda involuntária de urina associada ou imediatamente precedida por urgência miccional <sup>(145)</sup>. Nessa condição, a perda de urina ocorre independente do esforço e a micção, uma vez iniciada, não consegue ser interrompida <sup>(118)</sup>.

A incontinência urinária de esforço, principal queixa urinária das pacientes que procuram os ambulatórios de ginecologia <sup>(140)</sup>, é causada pela perda da resistência da musculatura perineal, que suporta o colo cervical e a uretra posterior, bem como pela atonia da musculatura pélvica por trauma (cirúrgico ou parto), idade e menopausa, atrofia da parede vaginal, inflamação vesical ou uretral, neuropatia diabética e obesidade <sup>(118)</sup>.

A fisiopatologia da incontinência urinária de esforço envolve alterações nos tecidos de suporte que estabilizam a uretra na posição correta e, ou disfunções que resultam em deficiência uretral intrínseca <sup>(119)</sup>.

Cerca de 20% das mulheres na pós-menopausa com incontinência urinária de esforço têm como causa a insuficiência esfinteriana intrínseca uretral. O mecanismo esfinteriano intrínseco

é formado pelo pregueamento da mucosa uretral, plexo vascular da submucosa, musculatura lisa e estriada peri-uretral e tecido conjuntivo, sendo que esse mecanismo pode ser comprometido por cirurgias vaginais, hipoestrogenismo e envelhecimento <sup>(140)</sup>. O hipoestrogenismo que ocorre após a menopausa tem sido sugerido como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da incontinência urinária de esforço, ao reduzirem o número de vasos peri-uretrais localizados na camada submucosa e dos receptores alfa-adrenérgicos da musculatura lisa uretral, e em decorrência da atrofia da mucosa uretral e dos músculos do assoalho pélvico, além das alterações no colágeno da região peri-uretral. Os estrogênios podem beneficiar todas essas estruturas, levando à melhora expressiva dos sintomas <sup>(119)</sup>.

Estudos realizados a partir da década de 1970 avaliaram se a administração de estrogênios na pós-menopausa produz melhora da incontinência urinária, atuando sobre a espessura da mucosa, na musculatura lisa e na vascularização da uretra, bem como no tecido conjuntivo peri-uretral, observando melhora da continência urinária <sup>(124, 146- 148)</sup>.

Suguita et al <sup>(149)</sup> observaram que a reposição estrogênica em ratas castradas, associada ou não a progestagênios, promoveu metaplasia, hiperplasia e aumento da espessura do epitélio do trato urinário baixo.

Endo et al <sup>(150)</sup> detectaram aumento da contagem de vasos em bexiga e uretra de ratas castradas, submetidas a tratamento com estrogênio isolado.

Sartori et al <sup>(142)</sup> verificaram que a reposição estrogênica de ratas castradas aumentou a quantidade de fibras musculares e diminuiu a quantidade de fibras colágenas, determinando diminuição da relação entre colágeno e músculo, no detrusor e na uretra.

De Deus et al <sup>(151)</sup> notaram diminuição de glicosaminoglicanos sulfatados em bexiga de ratas castradas. A terapia estrogênica isolada diminuiu ainda mais esses níveis e a terapia estroprogestínica reverteu essas alterações. Notaram também aumento da relação dermatam sulfato/hepam sulfato na bexiga após a castração, sendo essa alteração revertida pelo estrogênio isolado ou associado à progesterona. O hipoestrogenismo reduziu o conteúdo de ácido hialurônico vesical, sendo essa alteração revertida pela estrogênio terapia isolada, mas não pela combinada à progesterona. Em uretra, a terapia estrogênica diminuiu a relação dermatam sulfato/hepam sulfato e o conteúdo de ácido hialurônico não se alterou com a castração ou reposição com estrogênio e, ou progesterona.



Lee et al <sup>(118)</sup> utilizaram uma mistura de extratos de plantas com 6,55% de soja em ratas de 08 semanas, ooforectomizadas, submetidas a tratamento com diferentes doses desse extrato e avaliaram sua possível atuação na incontinência urinária. Notaram que a administração dos extratos não interferiu no ganho de peso dos animais e que o grupo tratado teve maior peso relativo vesical em relação ao controle. Além disso, verificaram maior quantidade de hidroxiprolina na bexiga do grupo tratado com as maiores doses dos extratos, em relação ao controle, e que os animais tratados tiveram maior secreção de estradiol, com níveis mais expressivos quando as menores doses foram usadas. Dessa forma, os autores notaram prevenção da queda da capacidade de contração vesical decorrente da castração, da deterioração anatomo-funcional da bexiga causada pela ooforectomia e restauração do número de fibras colágenas e do conteúdo de hidroxiprolina vesical pelos extratos, concluindo-se que a estimulação da secreção de estrogênios na periferia e os efeitos estrogênicos da mistura de extratos de plantas melhoraram a incontinência urinária, restaurando a função vesical, o que poderia ser extrapolado para as mulheres na pós-menopausa.

Ratz et al <sup>(152)</sup> avaliaram a ação do 17 beta-estradiol, progesterona, testosterona, tibolona, genisteína e daidzeína na contração induzida do músculo detrusor de coelhos e verificaram que o 17 beta-estradiol, o tamoxifeno e a genisteína têm capacidade de relaxar a musculatura vesical, o que poderia ser útil para o tratamento dos casos de urgência urinária.

Constatou-se, assim, que a literatura sobre os efeitos dos SERMS naturais na incontinência urinária é exígua.

Por essa razão, tornam-se necessários mais estudos no sentido de reafirmar o papel das isoflavonas, esclarecendo, também, se as mesmas têm efeito similar ao do estrogênio, no trato urinário baixo, o que poderia ser extremamente útil no manejo das pacientes na pós-menopausa com incontinência urinária, como alternativa à TH clássica.

**PROPOSIÇÃO**

No presente estudo propomo-nos a avaliar o número de fibras musculares, vasos sanguíneos e fibras colágenas na uretra e no útero de ratas castradas, tratadas com extrato de isoflavonas de soja, precoce e tardiamente à castração.

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado no Setor de Uroginecologia e Cirurgia Vaginal, do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), e no Laboratório da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM: projeto nº 1103/03 (ANEXO).

Foram selecionadas ratas adultas, virgens, de aproximadamente 90 dias, pesando em média 200g, *Rattus norvegicus albinus* (Rodentia Mammalia, Wistar EPM-1), provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina (CEDEME) da UNIFESP-EPM. Inicialmente, foram agrupadas 30 ratas para um estudo prévio de padronização das doses de isoflavonas (etapa I) e, posteriormente, 45 ratas para o experimento propriamente dito (etapa II).

Os animais foram levados para o Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural, sendo confinados em gaiolas plásticas com tampas gradeadas de metal, à temperatura de 22 °C, sob iluminação artificial produzida por lâmpadas fluorescentes da marca Philips, modelo luz do dia, com 40W de potência, com fotoperíodo claro e escuro de 12h cada. Foram mantidos com água e dieta *ad libitum*, utilizando-se ração especial à base de caseína e isenta de soja, Fórmula *Labina Especial* para roedores, desenvolvida pela Agribrands - Purina do Brasil, São Paulo – Br (ANEXO).

Em ambas as etapas do estudo, as ratas permaneceram cinco dias em adaptação no biotério, para depois serem submetidas à castração por ooforectomia bilateral, através de incisão dorsal.

A anestesia utilizada para a castração e sacrifício dos animais foi feita com solução de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), por via intraperitoneal.

Ao término das etapas I e II, as ratas foram novamente anestesiadas, submetidas à incisão abdominal mediana para remoção dos órgãos de interesse e sacrificadas em seguida, por aprofundamento do plano anestésico.

Utilizou-se extrato de isoflavonas a 40%, originário da China, lote 20030219, contendo 8,15% de genisteína e 19,19% de daidzeína. O produto tem certificado de Análise SP FARMA,

estando de acordo com as especificações da “United States Pharmacopeia”, ou “British Pharmacopeia” (ANEXO).

O extrato de isoflavonas foi administrado na dose diária de 1 mL para cada animal, por gavagem, diluído em propilenoglicol, de modo a se obterem as dosagens pré-estabelecidas de isoflavonas para cada grupo de ratas. Para esse procedimento, utilizou-se sonda metálica desenvolvida pelo Departamento de Farmacologia da UNIFESP-EPM.

### Etapa I

A etapa I do estudo foi realizada para se obter a dose ideal de isoflavonas que determina maior aumento de peso uterino nas ratas castradas <sup>(153-155)</sup>, tomando-se por base a quantidade de genisteína, já que se trata da fração mais potente desse fitoestrogênio. Esta etapa foi necessária, por causa da falta de padronização da dose de isoflavonas administrada por via oral, em ratas Rodentia Mammalia Wistar, nas concentrações presentes no extrato utilizado.

No quinto dia após a castração, 30 ratas foram divididas aleatoriamente em cinco grupos, a saber:

Grupo I (controle) – 6 ratas que receberam 1 mL por dia do veículo de administração do extrato (propilenoglicol), durante 21 dias;

Grupo II – 6 ratas que receberam 1 mL por dia de extrato de isoflavonas na dose de 0,5 mg de genisteína por 200g de peso corporal (PC) por dia, durante 21 dias (genisteína – 2,5 µg/g PC/ dia);

Grupo III – 6 ratas que receberam 1 mL por dia de extrato de isoflavonas na dose de 5,0 mg de genisteína por 200g de peso corporal por dia, durante 21 dias (genisteína – 25 µg/g PC/ dia);

Grupo IV – 6 ratas que receberam 1 mL por dia de extrato de isoflavonas na dose de 10,0 mg de genisteína por 200g de peso corporal por dia, durante 21 dias (genisteína 50 µg/g PC/ dia); e

Grupo V – 6 ratas que receberam 1 mL por dia de extrato de isoflavonas na dose de 25,0 mg de genisteína por 200g de peso corporal por dia, durante 21 dias (genisteína 125 µg/g PC/ dia).

Após 21 dias, todos os animais foram pesados, anestesiados e exangüinados mediante secção dos vasos cervicais. Posteriormente, foram colocados em decúbito dorsal e, após incisão ventral longitudinal, os dois cornos uterinos foram imediatamente coletados e conservados em solução salina. Para determinação do peso úmido do útero, os órgãos foram secos entre folhas de papel de filtro e pesados em balança analítica (Modelo AB 204 Metter). Foi calculado o peso dos úteros dos animais em relação ao peso corporal – peso relativo em mg de peso úmido/100g de peso corporal, e a média destes pesos está representada na Figura 4.

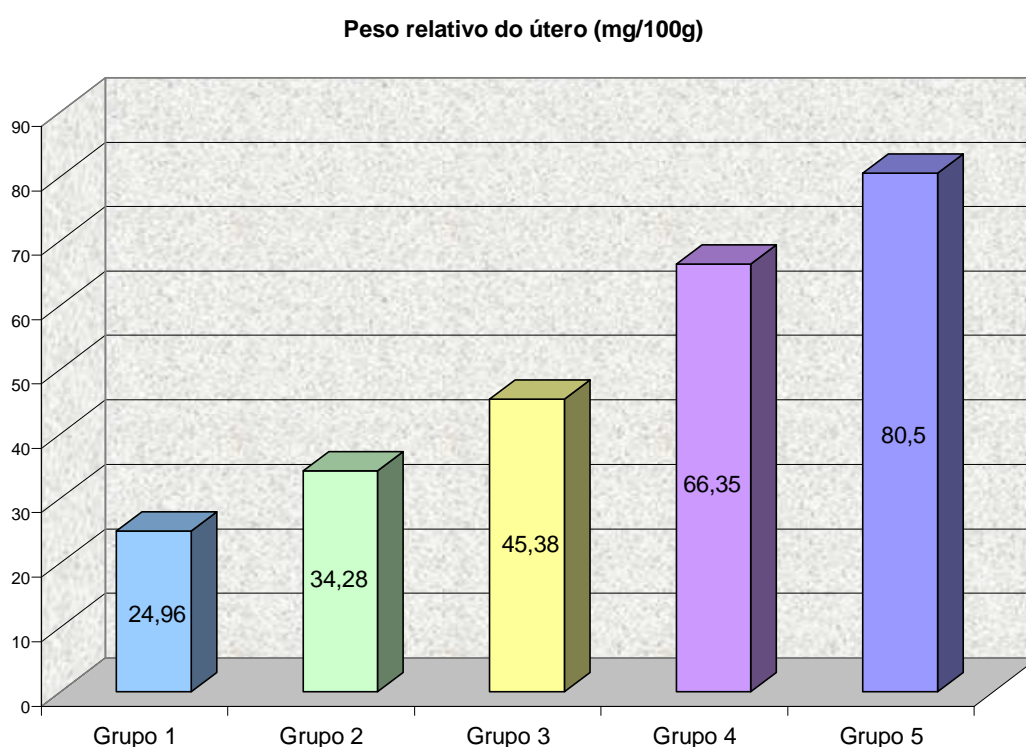


Figura 4 – Gráfico demonstrativo da média dos pesos relativos uterinos em mg de peso úmido/100g de peso corporal de ratas castradas com e sem administração de genisteína durante 21 dias.

Nas variáveis peso corporal, peso do útero e peso relativo do útero aplicou-se a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para discriminar entre quais grupos houve diferença. As variáveis foram descritas numericamente como média e desvio padrão. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,05 ou 5%, sendo os valores significantes assinalados com asterisco (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias e desvio-padrão da média do peso corporal dos animais, do peso uterino e do peso relativo do útero (mg tecido úmido/100g de peso corporal) dos animais castrados (Controle) e dos animais castrados e medicados com diferentes doses de genisteína (2,5; 25; 50; 125µg/g de peso corporal/dia)

|                         | GRUPOS                      |                               |                              |                              |                               |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|                         | Grupo 1                     | Grupo 2                       | Grupo 3                      | Grupo 4                      | Grupo 5                       |
|                         | CAST<br>(N=5)<br>Média ± DP | 2,5 µg<br>(N=6)<br>Média ± DP | 25 µg<br>(N=6)<br>Média ± DP | 50 µg<br>(N=6)<br>Média ± DP | 125 µg<br>(N=6)<br>Média ± DP |
| Peso corporal (g)       | 235,4 ± 25,9                | 227,3 ± 33,9                  | 209,6 ± 20,2                 | 214,1 ± 22,7                 | 202,0 ± 13,8                  |
| Peso uterino (mg)       | 70,9 ± 15,1                 | 78,5 ± 17,5                   | 94,9 ± 18,7                  | 139,8 ± 35,7*                | 160,7 ± 59,4*                 |
| Peso útero/PC (mg/100g) | 29,9 ± 5,0                  | 34,3 ± 5,2                    | 45,4 ± 8,7                   | 66,4 ± 0,3*                  | 80,1 ± 0,1*                   |

(\*) Diferenças significantes. Testes de comparações múltiplas de Dunn.

Castradas vs. 50 µg \* P<0,01

Castradas vs. 125 µg \* P<0,01

2,5 µg vs. 125 µg \* P<0,05

A dose ideal do extrato de isoflavonas foi estabelecida com base na genisteína, após verificar a resposta no órgão-alvo útero. Utilizou-se, então, 125 µg de genisteína por grama de peso corporal por dia, para a segunda etapa do estudo.

## Etapa II

Quarenta e cinco ratas previamente castradas foram divididas aleatoriamente em três grupos de 15 animais, assim distribuídos:



Grupo I (controle) - 15 ratas que receberam o veículo do extrato (propilenoglicol), a partir do quinto dia de castração, na dose de 1 mL por dia, durante 30 dias consecutivos;

Grupo II (ISO5D) - 15 ratas tratadas com genisteína na dose de 125 µg/g peso corporal por dia, a partir do 5º dia da castração, por 30 dias consecutivos e,

Grupo III (ISO28D) - 15 ratas tratadas com genisteína na dose de 125 µg/g peso corporal por dia, a partir do 28º dia da castração, por 30 dias consecutivos.

Ao final dos 30 dias, todos os animais foram novamente anestesiados e colocados em decúbito dorsal. Realizou-se incisão abdominal longitudinal e remoção do trato genito-urinário baixo, em bloco, contendo bexiga, uretra e útero, além de parte da vagina. Em seguida, os animais foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico.

O material extraído foi então dissecado, tendo sido identificados três regiões distintas da uretra (proximal, média e distal) e o útero. As porções médias da uretra e o útero de cada animal foram colocados para fixação em solução de formaldeído a 10%, por 24 h, sendo em seguida processadas para inclusão em parafina, segundo metodologia histológica.

Após a fixação, as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas pelo xilol, e impregnadas em parafina líquida, em estufa regulada à temperatura de 59°C, segundo o método preconizado por Masson<sup>(156)</sup>. Posteriormente, o material foi incluído em blocos de parafina, de forma que se obtivessem cortes transversais, perpendiculares ao maior eixo das estruturas a serem analisadas. Os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (marca Leica, modelo RM2035), ajustado para a espessura de 5µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas, corados pela hematoxilina e eosina, cobertos por lamínulas e levados à estufa regulada à temperatura de 37°C por 24h para secagem.

Para leitura das lâminas, utilizou-se microscópio de luz com ocular de 10X e objetiva de 40X, resultando em aumento final de 400X.

Para análise morfométrica, foi realizada a contagem de número de núcleos, de vasos sanguíneos e de fibras colágenas pela técnica do “test point-counting volumetry”, descrita por Weibel et al<sup>(157)</sup>, utilizando-se ocular de integração com retículo contendo 25 pontos,

geometricamente distribuídos (integration platte 1 KPLW 10X, Carl Zeiss), acoplada à microscopia de luz, com objetiva de 40X.

Para cada animal, confeccionou-se uma lâmina contendo uma secção de uretra e de útero. Para cada secção de uretra e útero, foram selecionados 10 campos ao acaso, e em cada campo contaram-se 25 pontos. Num total de 74 secções, contaram-se 18.500 pontos, 9.250 pontos para cada órgão estudado. Os núcleos, vasos sanguíneos e fibras colágenas eram incluídos na contagem somente se estivessem localizados nos pontos de intersecção entre as linhas horizontais e verticais da ocular de integração, sendo desprezadas estruturas que estivessem fora desses pontos.

Para análise dos resultados obtidos, foi feita análise de variância para as variáveis: número de núcleos, número de fibras colágenas e número de vasos, contados na uretra e útero dos grupos estudados. A esses dados, aplicou-se o teste Lilliefors para verificação de normalidade e os testes Cochran e Bartlett para homogeneidade de variâncias. As médias das variáveis foram comparadas pelos testes Dunnett e Tukey. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,05 ou 5%.

**RESULTADOS**

## Resultados Morfológicos

### Útero

No estudo morfológico dos animais castrados, o útero apresentou-se delgado e atrófico. O endométrio mostrou-se revestido por epitélio pavimentoso ou cúbico simples. Abaixo do mesmo, havia inúmeras células contendo núcleo intensamente corado (heterocromático), citoplasma pouco desenvolvido e ausência de eosinófilos. As glândulas endometriais eram pouco desenvolvidas, formadas por epitélio cúbico simples. A região adjacente ao miométrio apresentou-se rica em fibras colágenas (Figuras 5a e b).

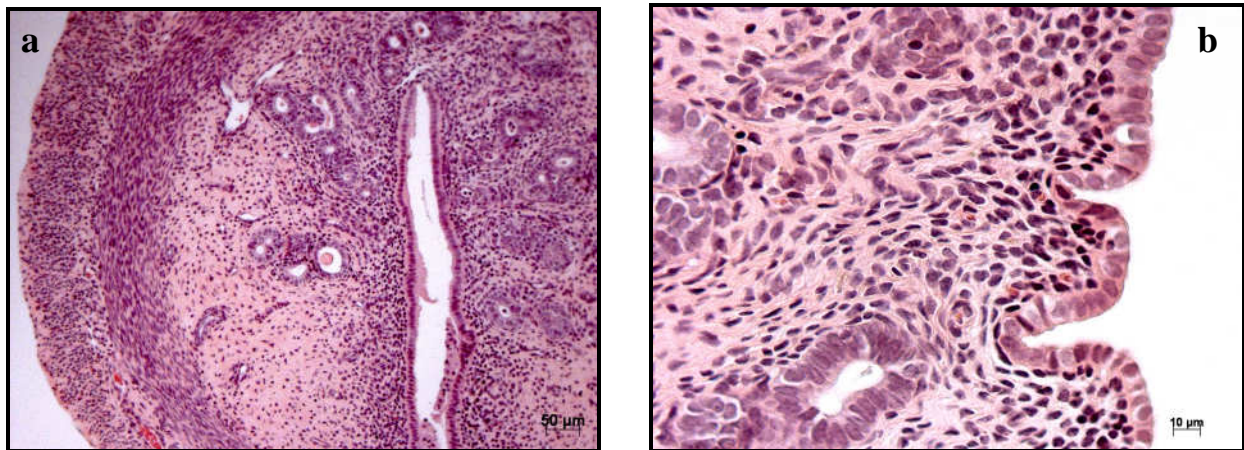


Figura 5 – Fotomicrografia do útero de rata castrada: (a) aumento de 100X (H.E.); (b) aumento de 400X (H.E.)

Nos grupos tratados com isoflavonas (GII e GIII) nota-se que os úteros apresentam-se mais desenvolvidos, com paredes mais espessas e endométrio rico em células e matriz intercelular (Figuras 6 a e b e 7 a e b).

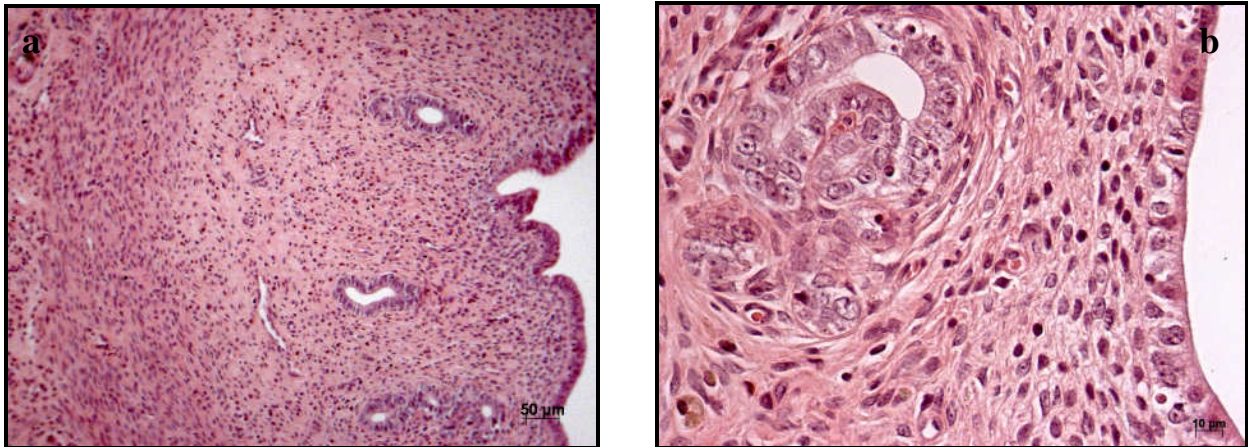


Figura 6 – Fotomicrografia do útero de rata castrada e submetida à terapia precoce com isoflavona: (a) aumento de 100X (H.E.); (b) aumento de 400X (H.E.)

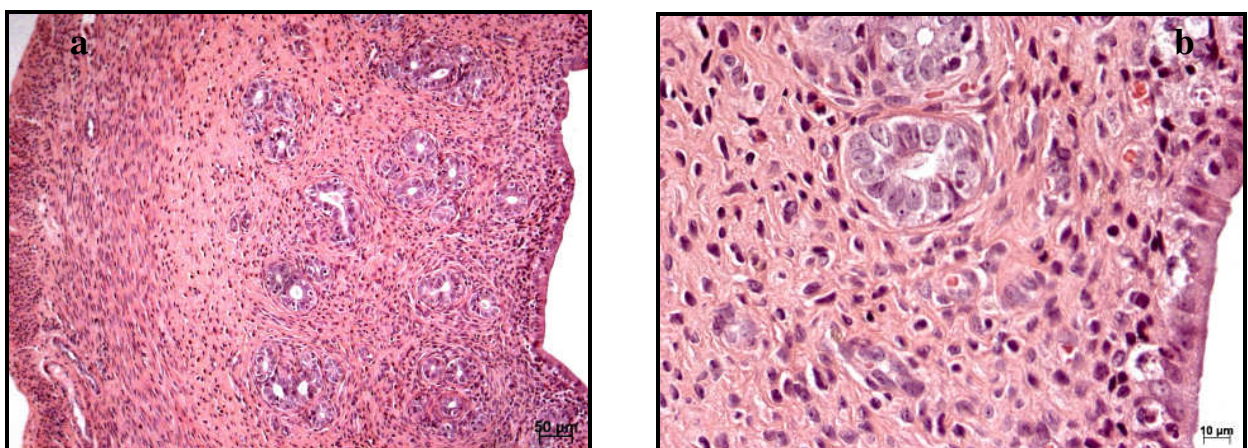


Figura 7 – Fotomicrografia do útero de rata castrada e submetida à terapia tardia com isoflavona: (a) aumento de 100X (H.E.); (b) aumento de 400X (H.E.).



## Uretra

Nota-se semelhança entre a morfologia da uretra nos vários grupos estudados, ou seja, mostraram-se revestidas por epitélio de transição apoiado em lâmina própria e, abaixo, feixes de músculo liso. Nota-se que no grupo II (ISO5D) o epitélio de transição apresentou-se mais espesso do que nos outros grupos (Figuras 8a e b, 9a e b e 10a e b).

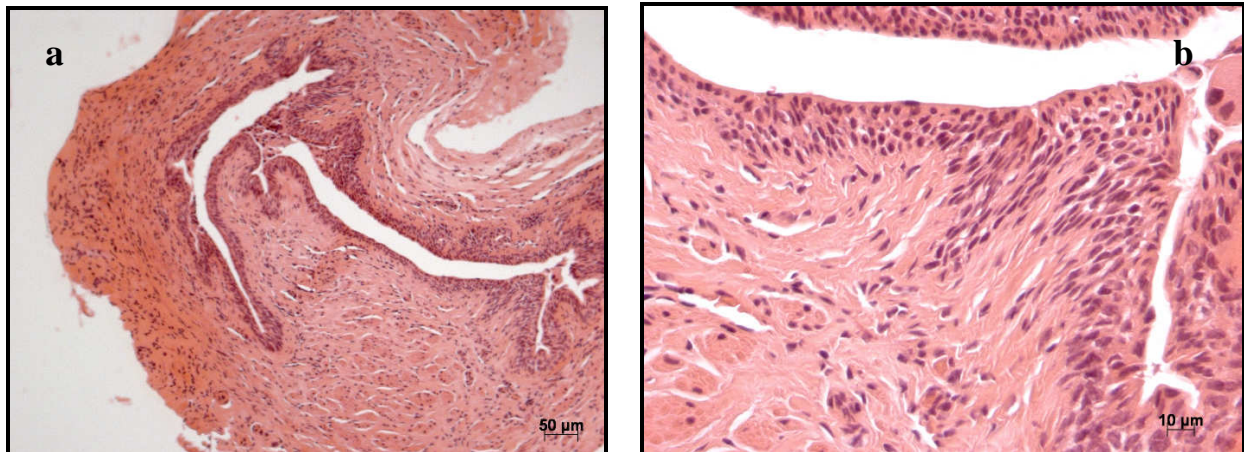


Figura 8 – Fotomicrografia da uretra de rata castrada: (a) aumento de 100x (H.E.); e (b) aumento de 400X (H.E.).

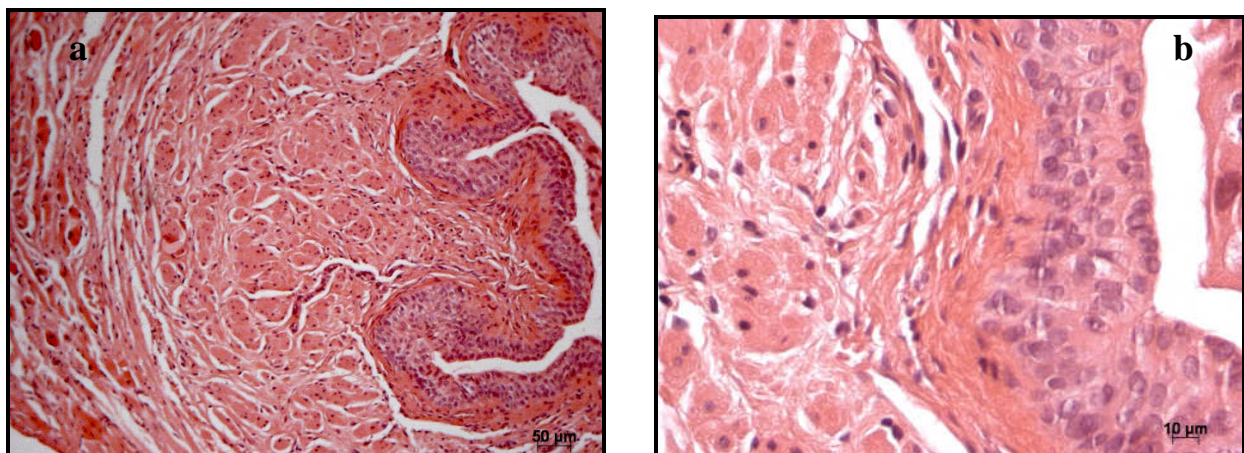


Figura 9 – Fotomicrografia da uretra de rata castrada e submetida à terapia precoce com isoflavanos: (a) aumento de 100x (H.E.); e (b) aumento de 400x (H.E.).

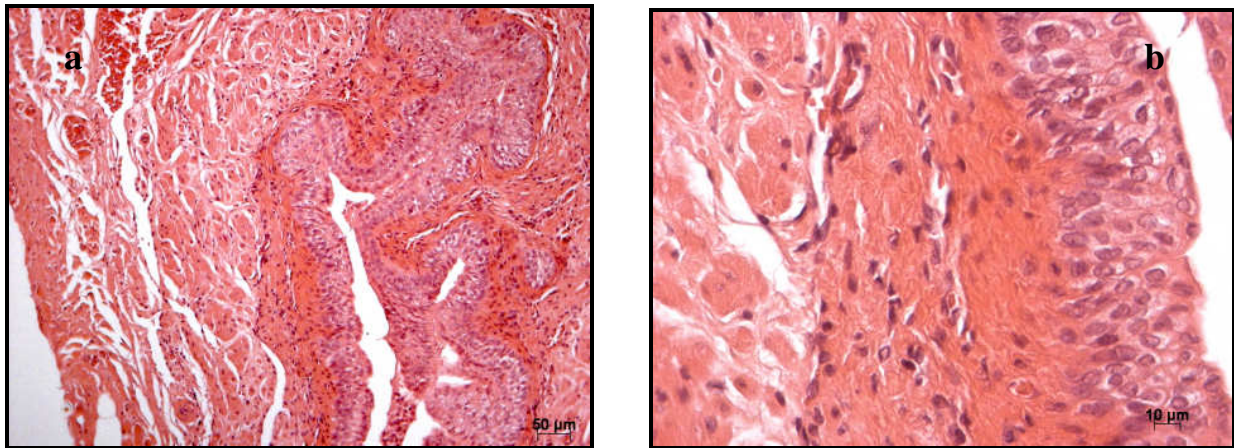


Figura 10 – Fotomicrografia da uretra de rata castrada e submetida à terapia tardia com isoflavonas: (a) aumento de 100x (H.E.); e (b) aumento de 400x (H.E.)

## Resultados Morfométricos

Na tabela 3, encontra-se o resumo da análise de variância para as variáveis número de núcleos, número de fibras colágenas e número de vasos, da uretra e útero, dos grupos I (C), II (ISO5D) e III (ISO28D). Verificou-se diferenças significantes para todas as características com exceção do número de vasos da uretra (Tabela 3).

Nas figuras 11 e 12 e nas tabelas 4 e 5, estão expressas as médias das variáveis para os respectivos grupos. Os dados foram analisados por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelos testes de Dunnett e Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

Analisando-se a tabela 4, em relação ao útero, observa-se que os grupos tratados precoce e tardiamente com isoflavonas diferem do grupo controle em todas as características. Em se tratando da uretra, nota-se que apenas o grupo tratado precocemente com isoflavonas difere do grupo controle nas características número de núcleos e de fibras colágenas (Tabela 4).

Na tabela 5, comparando-se os grupos tratados precoce e tardiamente com isoflavonas, observa-se que não há diferença entre eles para todas as características, em relação ao útero. Analisando-se a uretra, houve diferença entre os grupos tratados para as características número de núcleos e de fibras colágenas (Tabela 5).

Tabela 3 – Resumo da análise de variâncias das variáveis número de núcleos, vasos e fibras colágenas, na uretra média e no útero, de ratas castradas e tratadas com isoflavonas precoce e tardiamente à castração

| Fontes de variação           | Quadrados médios |          |                  |          | Quadrados médios |         |                  |                     |
|------------------------------|------------------|----------|------------------|----------|------------------|---------|------------------|---------------------|
|                              | GL               | Útero    |                  |          | GL               | Uretra  |                  |                     |
|                              |                  | Núcleos  | Fibras colágenas | Vasos    |                  | Núcleos | Fibras colágenas | Vasos               |
| Grupos                       | 2                | 710,36** | 288,66**         | 462,84** | 2                | 57,88 * | 76,29 *          | 34,65 <sup>NS</sup> |
| Resíduo                      | 48               | 69,29    | 47,64            | 35,57    | 28               | 11,10   | 19,70            | 18,14               |
| Coefficiente de variação (%) |                  | 17,32    | 14,21            | 23,63    |                  | 12,72   | 9,929            | 14,26               |

(\*) F significativo ao nível de 5% de probabilidade  
 (\*\*) F significativo ao nível de 1% de probabilidade  
 (NS) F não significativo ao nível de 5% de probabilidade  
 (GL) Grau de liberdade

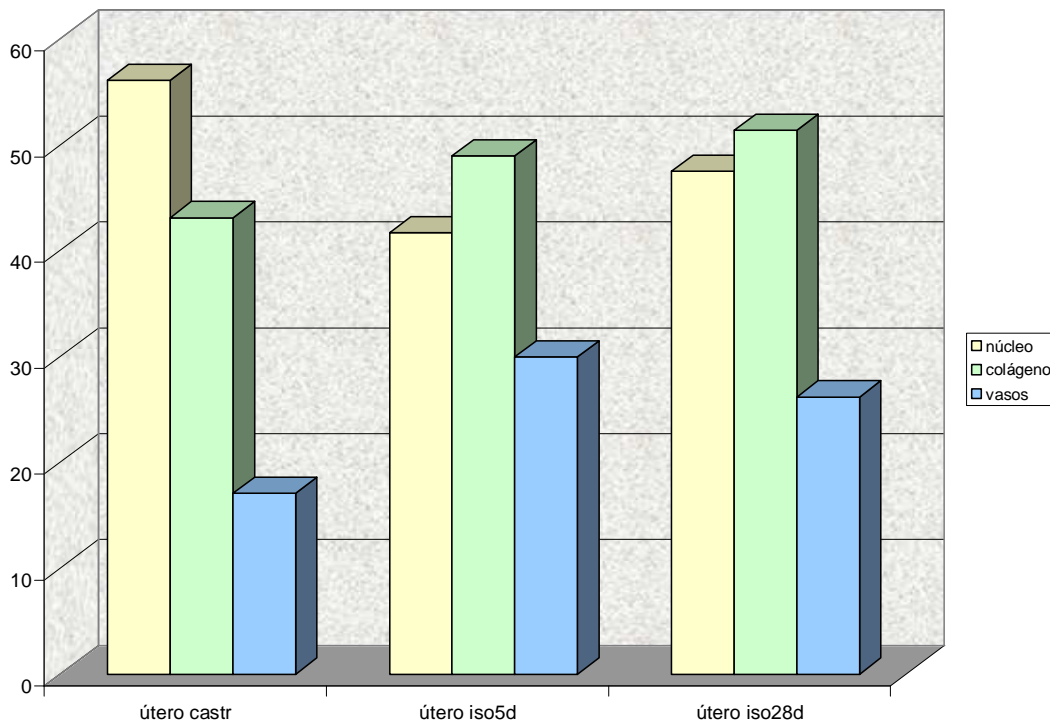


Figura 11 – Gráfico demonstrativo da média do número de núcleos, fibras colágenas e vasos no útero de ratas castradas e de ratas tratadas precoce e tardiamente à castração com isoflavonas.



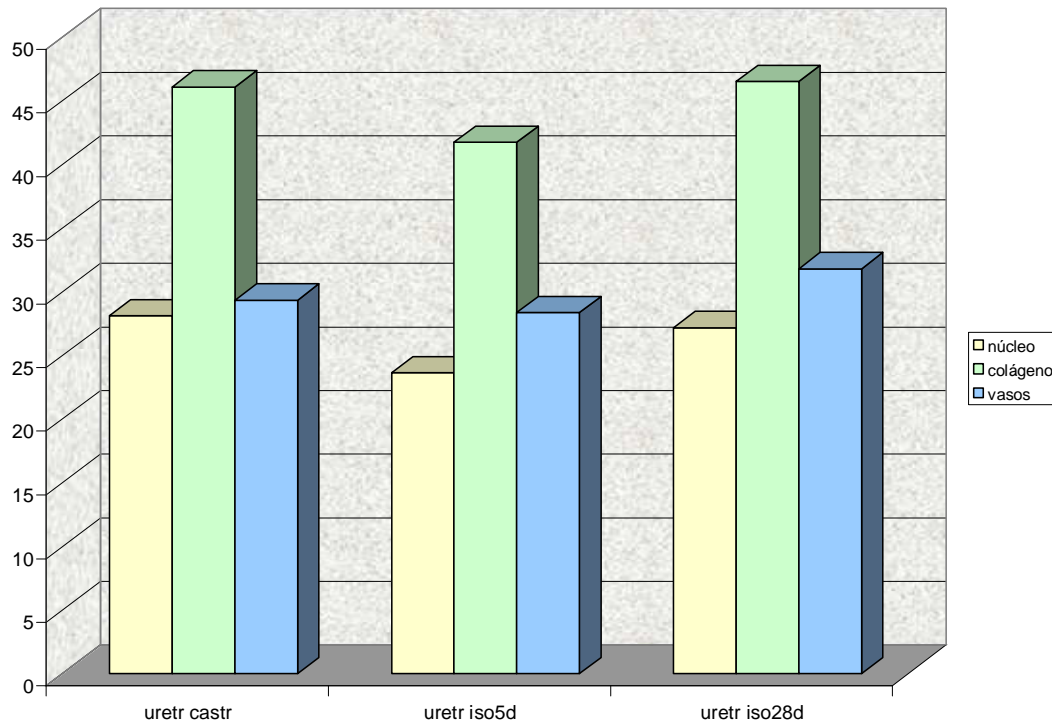


Figura 12 – Gráfico demonstrativo da média do número de núcleos, fibras colágenas e vasos na uretra de ratas castradas e de ratas tratadas precoce e tardiamente à castração com isoflavonas

Tabela 4 - Médias do número de núcleos, vasos e fibras colágenas na uretra média e no útero, de ratas castradas e tratadas com isoflavonas precoce e tardiamente à castração

|        |                  | Grupos    |          |           |
|--------|------------------|-----------|----------|-----------|
|        |                  | Grupo I   | Grupo II | Grupo III |
|        |                  | Castradas | ISO 5D   | ISO 28D   |
| Útero  | Núcleos          | 56,07     | 41,64 *  | 47,45 *   |
|        | Fibras colágenas | 43,07     | 48,92 *  | 51,33 *   |
|        | Vasos            | 18,46     | 29,92 *  | 26,16 *   |
| Uretra | Núcleos          | 28,11     | 23,63 *  | 27,18     |
|        | Fibras colágenas | 46,11     | 41,72 *  | 46,54     |
|        | Vasos            | 29,33     | 28,36    | 31,81     |

As médias com \* na linha para cada variável diferem do padrão ou controle a 5% de probabilidade pelo teste Dunnett

Tabela 5 - Médias do número de núcleos, vasos e fibras colágenas na uretra média e no útero, de ratas castradas e tratadas com isoflavonas precoce e tardiamente à castração

|        |                  | Grupos               |                     |                      |
|--------|------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|        |                  | Grupo I<br>Castradas | Grupo II<br>ISO 5D  | Grupo III<br>ISO 28D |
| Útero  | Núcleos          | 56,07 <sup>a</sup>   | 41,64 <sup>b</sup>  | 47,45 <sup>b</sup>   |
|        | Fibras colágenas | 43,07 <sup>b</sup>   | 48,92 <sup>ab</sup> | 51,33 <sup>a</sup>   |
|        | Vasos            | 18,46 <sup>b</sup>   | 29,92 <sup>a</sup>  | 26,16 <sup>a</sup>   |
| Uretra | Núcleos          | 28,11 <sup>a</sup>   | 23,63 <sup>b</sup>  | 27,18 <sup>a</sup>   |
|        | Fibras colágenas | 46,11 <sup>ab</sup>  | 41,72 <sup>b</sup>  | 46,54 <sup>a</sup>   |
|        | Vasos            | 29,33                | 28,36               | 31,81                |

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

**DISCUSSÃO**

Os fitoestrógenos são compostos vegetais não-esteróides, que contêm um grupo fenólico posicionado de maneira similar aos estrogênios. Nas plantas, têm importantes funções: atuam como fungicidas, detêm a herbivoria, regulam os hormônios vegetais, protegem as plantas contra os raios ultravioletas e funcionam como antioxidantes <sup>(158)</sup>.

Essas substâncias têm sido mais profundamente estudadas, desde a década de 40, quando se notou que ovelhas australianas alimentadas do trevo vermelho tinham alterações na sua fertilidade. Desde então, pelas suas propriedades estrogênicas, surgiu especial interesse nos mesmos para aplicação em humanos, principalmente pelas mulheres na peri e pós-menopausa, na tentativa de alívio dos sintomas vasomotores, benefícios cardiovasculares, proteção contra osteoporose, sem aumento da incidência de determinados tipos de câncer, como o de mama, ou até mesmo como um possível fator de proteção para alguns, relacionados ou não ao uso de hormônios.

Dentre os fitoestrógenos, os mais estudados são, sem dúvida, as isoflavonas, em especial a genisteína.

Evidentemente, alimentos e suplementos que contêm isoflavonas têm efeitos fisiológicos <sup>(84)</sup>. Porém, a literatura ainda é muito controversa sobre quais são esses efeitos nos animais e na espécie humana e em que condições eles ocorrem.

Vários são os fatores que contribuem para uma falta de consenso sobre a ação das isoflavonas.

O fato de haver entre os diversos tipos de suplementos disponíveis comercialmente à base de isoflavonas de soja uma grande diferença quantitativa e qualitativa nas isoflavonas presentes <sup>(159)</sup> contribui em parte para a controvérsia existente na literatura. Essa grande variabilidade na composição dos diferentes produtos à base de soja testados pode ser explicada pelo fato de os extratos de fitoestrógenos serem considerados suplementos alimentares, não sendo submetidos a estrito controle <sup>(160)</sup>.

Sabe-se também que a concentração de isoflavonas na soja e em seus derivados depende do tipo de alimento, da variedade da soja, do ano de colheita, da localização geográfica <sup>(161-162)</sup>, da forma de cultivo e de armazenamento <sup>(75)</sup>, entre outros fatores. Também, as condições de processamento da soja podem provocar alterações no teor total e no perfil das isoflavonas presentes. Os isoflavonóides provenientes de matéria-prima já processada, que passam por

processo de fermentação, proporcionam maior teor de agliconas (forma biologicamente ativa, absorvida mais rapidamente e em maior quantidade do que a forma glicosilada), 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 <sup>(163)</sup>.

A composição do alimento e da dieta também pode afetar a biodisponibilidade dos fitoestrógenos <sup>(164)</sup>. Uma dieta rica em carboidratos induz aumento da fermentação, podendo resultar em maior quebra de daidzeína a equol. Já a dieta rica em gorduras diminui a capacidade da microflora intestinal em produzir equol. Cita-se, ainda, a presença de doenças intestinais, parasitoses e uso de antibióticos como fatores de interferência <sup>(75, 58)</sup>. Também as taxas de absorção e a biodisponibilidade dos fitoestrógenos dependem da quantidade absoluta dos mesmos em um gênero alimentício, de sua estrutura química e do processamento do alimento <sup>(165)</sup>.

Outro fator importante diz respeito ao metabolismo das isoflavonas. As formas agliconas são absorvidas mais rapidamente que os beta-glicosídeos <sup>(54)</sup> e a genisteína é absorvida de maneira mais eficaz que a daidzeína, mantendo altas concentrações plasmáticas.

As principais isoflavonas podem ser encontradas em quatro formas: não-conjugada ou aglicona, conjugada ou glicosada (genisteína, daidzeína), acetilglicosilada e malonilglicosilada. Após a ingestão, as formas conjugadas sofrem a ação das  $\beta$ -glucosidases de bactérias intestinais, sendo transformadas em agliconas. A partir daí, podem ser absorvidas ou metabolizadas também pelas bactérias intestinais, produzindo metabólitos específicos, como, por exemplo, o equol, a partir da daidzeína, e o p-etinilfenol a partir da genisteína. As agliconas e, ou os metabólitos absorvidos são transportados até o fígado, onde podem ser conjugados com o ácido glucurônico ou com sulfato, em proporção bem menor. A partir daí, podem ser excretados pela urina ou bile. Os compostos conjugados com ácido glucurônico podem ainda sofrer recirculação êntero-hepática, sendo desconjugados no intestino e reabsorvidos ou excretados nas fezes. Os estudos indicam também que a absorção das isoflavonas depende diretamente da quantidade ingerida <sup>(58)</sup>. Assim como no metabolismo dos hormônios esteróides, o fígado tem papel importante na conjugação das agliconas com ácido glucurônico. A eficiência de conjugação das isoflavonas é elevada e, conseqüentemente, a proporção de isoflavonas circulantes na forma livre é pequena <sup>(75)</sup>. Sendo assim, os glucuronídeos constituem a principal forma circulante das isoflavonas, sendo formas inativas que atuam como reservatórios permanentes, mantendo níveis persistentes das isoflavonas encontradas no plasma <sup>(160)</sup>.

Variações individuais são responsáveis por grande impacto no metabolismo e na excreção dos fitoestrógenos. A microflora intestinal, variável de pessoa para pessoa, é responsável pela mudança estrutural prévia à absorção. Ainda, sabe-se muito pouco, atualmente, sobre a estrutura química das formas absorvidas de fitoestrógenos<sup>(166)</sup>. Estima-se que em torno de 40% a 60% da população tem a capacidade de produzir o equol por bactérias colônicas<sup>(167-171)</sup> e este metabólito parece ser bastante ativo<sup>(167, 168, 172)</sup>. A concentração plasmática das isoflavonas é extremamente variável entre a população<sup>(171, 173)</sup>. Já foi observada, entre diversos indivíduos, uma variação da ordem de dezesseis vezes na excreção urinária total de isoflavonóides e de seiscentos e sessenta e quatro vezes na excreção urinária de equol<sup>(174)</sup>. Alguns autores relatam uma variação individual ainda maior, chegando a 1.000 vezes na excreção subsequente de isoflavonas<sup>(61)</sup>. Além disso, a excreção urinária das isoflavonas parece variar de acordo com as doses ingeridas diariamente, sendo inversamente proporcional a essas, o que poderia ser explicado por saturação de enzimas envolvidas no processo metabólico<sup>(171)</sup>. Além das variações da flora intestinal, a capacidade de degradação de cada indivíduo e o tempo em que as isoflavonas permanecem no intestino também são muito variáveis.

Também, entre os animais, a sensibilidade das diferentes linhagens, de acordo com os órgãos examinados, pode variar na avaliação dos fitoestrogênios. Vários autores já relataram essa variação de resposta a compostos estrogênicos e antiestrogênicos, em diferentes órgãos animais<sup>(175-183)</sup>. Mais recentemente, Nakai et al<sup>(184, 185)</sup> reforçaram esses achados, ao fazerem um mesmo protocolo para pesquisas em duas subespécies de ratas, encontrando resultados diferentes. No primeiro estudo<sup>(184)</sup>, os autores trabalharam com ratas Sprague-Dawley para avaliação pré-menopausa das proteínas da soja e isoflavonas no osso e trato reprodutivo. Encontrou-se extensa metaplasia escamosa do epitélio glandular uterino em 15% das ratas no grupo que ingeriu altas quantidades de proteínas de soja e isoflavonas, uma resposta bem conhecida ao estímulo estrogênico, e nenhum efeito óbvio em osso ou vagina. No segundo estudo<sup>(185)</sup>, avaliaram ratas Fisher em condições semelhantes, não sendo evidenciadas as alterações histológicas anteriormente descritas (nenhuma alteração no trato reprodutivo das ratas foi observada). As explicações podem ser por diferença na absorção e no metabolismo das isoflavonas e proteínas da soja, na afinidade das isoflavonas aos receptores estrogênicos ou no próprio receptor estrogênico (nos níveis de RNAm e proteína dos receptores estrogênicos)<sup>(183)</sup>.

As diferentes vias de administração das isoflavonas utilizadas nas pesquisas também podem constituir um fator que dificulta a interpretação dos resultados.

Outro aspecto importante a ser considerado diz respeito ao modo de atuação das isoflavonas. O principal mecanismo de ação das isoflavonas nos tecidos alvos parece ser o genômico, mediado por receptores nucleares específicos, resultando em efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos.<sup>(66)</sup> Os receptores estrogênicos são de dois tipos:  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) e  $\beta$  (RE $\beta$ )<sup>(186)</sup>, e, sob determinadas condições, esses receptores podem determinar efeitos opostos na transcrição de genes<sup>(187)</sup>. Estudos sugerem que as distribuições desses receptores nos tecidos variam, sendo que os RE $\alpha$  apresentam larga expressão tecidual, principalmente nos tecidos endometriais, mamários e hepáticos<sup>(67, 188)</sup>. Os RE $\beta$ , no entanto, possuem expressão mais focal, com altos níveis principalmente em ovário, próstata, epidídimo, pulmão, hipotálamo, endotélio vascular, ossos e bexiga<sup>(67, 83, 189)</sup>. A concentração dos receptores nos tecidos determina sua resposta ao hormônio<sup>(190)</sup>. A seletividade dos fitoestrógenos para os diferentes receptores também é importante na modulação da resposta tecidual. As isoflavonas apresentam maior afinidade para receptores  $\beta$ <sup>(189, 191)</sup>, que são pouco expressivos nos tecidos endometriais e mamários, o que, teoricamente, determinaria pequena ou nenhuma ação nesses locais. Segundo Kuiper e colaboradores<sup>(85)</sup>, a afinidade da genisteína é 5 a 20 vezes maior pelo RE $\beta$  do que pelo RE $\alpha$ .

Outra variável importante é a concentração da droga. Alguns fitoestrógenos podem exercer efeito agonista ou antagonista, dependendo de sua concentração<sup>(192)</sup>. As isoflavonas são 500 a 1.000 vezes mais fracas que os estrogênios endógenos, mas o mesmo nível de bioatividade pode ser produzido pelas isoflavonas e pelo estradiol, desde que haja concentrações suficientemente altas para se obter máximas respostas, indicando que os complexos receptor estrogênio e receptor isoflavonóide podem ser funcionalmente equivalentes<sup>(78)</sup>.

As isoflavonas, portanto, podem apresentar efeito estrogênico ou antiestrogênico, dependendo do tipo de receptor estimulado, da concentração desses receptores no tecido, do tipo de isoflavona e de sua concentração no organismo, entre outros.

Tem sido descrito que as isoflavonas podem agir também por meio de mecanismos classificados como não-genômicos. Os efeitos expressos por esses mecanismos são determinados por ações sobre a inibição enzimática, inibição da angiogênese e efeitos antioxidantes<sup>(193, 194)</sup>. Os fitoestrógenos podem afetar a função celular via interação direta com enzimas celulares tais como 5-lipoxigenase, ciclo-oxigenase, AMP cíclico-fosfodiesterase, proteíno-quinases, DNA topoisomerase II e 11  $\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase<sup>(153)</sup>, enzimas envolvidas no metabolismo estrogênico e proteíno-quinases envolvendo sinalização intracelular. Também, são descritos efeitos no transporte de glicose<sup>(84, 195)</sup> e ações de inibição da expressão e transcrição de

alguns genes que promovem a regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular <sup>(194)</sup>. De maneira similar ao complexo receptor estrogênio-tamoxifeno, o complexo receptor estrogênio-genisteína pode modular a expressão de genes que não contêm elemento da resposta estrogênica clássica, na sua região regulatória, como o gene TGF- $\beta$ 3 <sup>(196)</sup> ou o complexo pode interagir com elemento da resposta estrogênica clássica, mas com cinéticas diferentes, comparadas com o complexo receptor estrogênio-estradiol <sup>(197)</sup>.

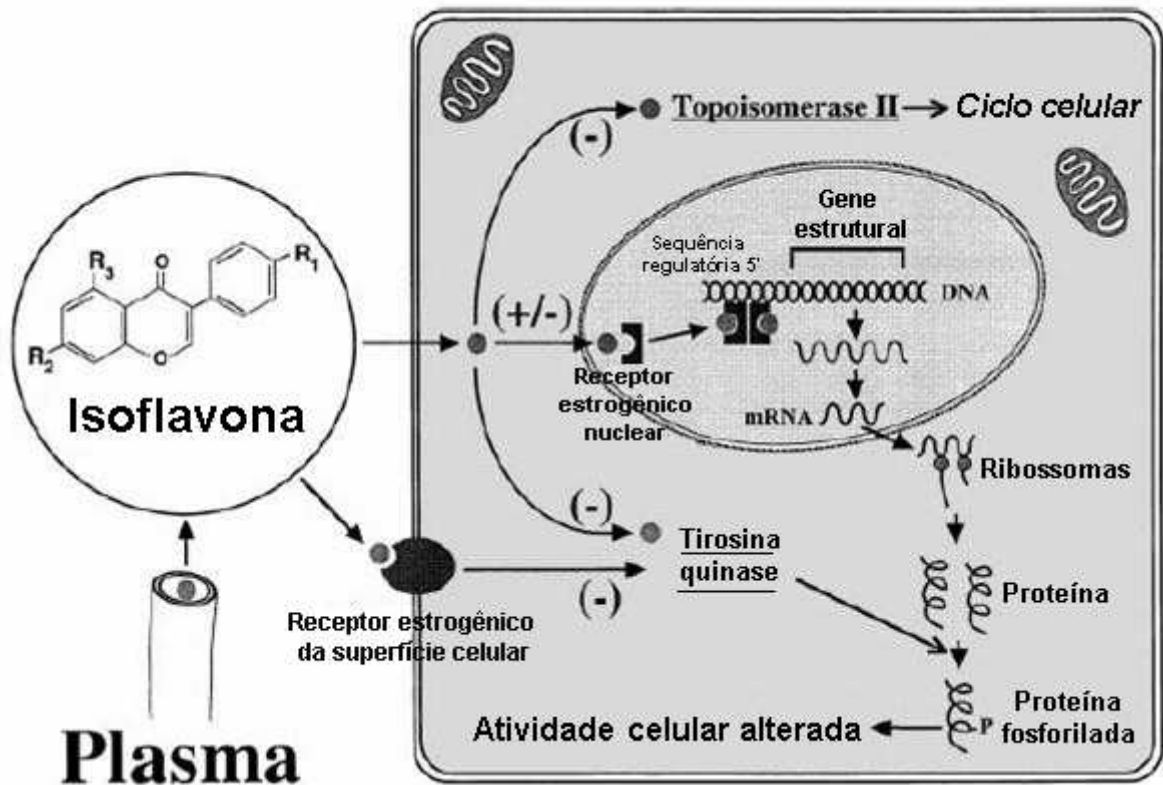


Figura 13 – Ações genômicas e não-genômicas das isoflavonas nas células. As isoflavonas podem interagir de forma clássica com receptores nucleares estrogênicos, inibindo ou ativando a transcrição de genes celulares específicos. Efeitos não-genômicos dos fitoestrogênicos podem incluir inibição de efeitos em outras moléculas como topoisomerase II e tiosino-quinase.

Fonte: Anderson et al, 1999 <sup>(62)</sup>.

Todas essas variáveis mencionadas podem explicar as controvérsias observadas nos estudos. Outro aspecto importante diz respeito ao fato de grande parte das pesquisas com fitoestrogênicos ser realizada *in vitro* ou em animais, e os efeitos observados nem sempre podem ser extrapolados para humanos. O tamoxifeno, por exemplo, atua em ratos como agonista estrogênico, em sapos e galinhas como antagonista estrogênico e em humanos como



agonista/antagonista estrogênico <sup>(198)</sup>. Além disso, observa-se que muitos estudos epidemiológicos têm usado metodologia não apurada e têm sido conduzidos principalmente nas populações consumidoras da soja, sem distinção entre estado hormonal e sem considerar a interação com fatores constitucionais ou nutricionais. Os lignanos têm sido intensamente investigados epidemiologicamente e em modelos animais, apesar do seu conhecido efeito antiestrogênico <sup>(14)</sup>.

Face à grande variabilidade na composição dos suplementos à base de isoflavonas e nas doses empregadas nos diferentes estudos que utilizaram ratas castradas como modelo para menopausa, foi necessário um estudo prévio para padronização da dose ideal a ser utilizada, de acordo com as especificações do extrato disponível, para verificação posterior da atuação, ou não, das isoflavonas no trato urinário das ratas castradas. A escolha se deu pela análise do útero, órgão sabidamente sensível ao estímulo estrogênico, mais especificamente do peso uterino relativo.

Vários autores demonstraram que a exposição de ratas aos fitoestrogênios resultam em aumento de peso uterino <sup>(199-203)</sup>.

McClain et al <sup>(50)</sup> avaliaram a resposta a diferentes doses de genisteína por via oral, em ratas com menos de 08 semanas de vida, não ooforectomizadas, observadas por até 52 semanas, e obtiveram maior número de alterações indicativas de resposta estrogênica (como, por exemplo, o aumento do peso uterino) com a dose de 500mg/ kg de peso/ dia e após 04 semanas de observação. Consideraram a dose ideal como sendo de 50 mg/ kg de peso/ dia de genisteína, em razão da menor ocorrência de efeitos ditos como colaterais. A dose de 05 mg/ kg de peso/ dia foi ineficaz no estudo.

Okazaki et al <sup>(204)</sup> estudaram ratas de 07 semanas, submetidas a diferentes doses de genisteína, administradas por gavagem durante 28 dias, e determinaram como dose ideal a de 120mg/ kg de peso/ dia.

Santell et al <sup>(154)</sup> utilizaram diferentes doses de genisteína em ratas ooforectomizadas e verificaram aumento de peso uterino com as doses de 375 e 750 mg/ kg de peso/ dieta. Essas doses, quando administradas conjuntamente com estradiol, não antagonizaram os efeitos estrogênicos em útero e mama. A dose de 750 mg/ kg de peso/ dieta inibiu a regressão mamária decorrente da ooforectomia.

Burdette et al <sup>(205)</sup> avaliaram ratas de 50 dias, ooforectomizadas, seguidas por 21 dias, submetidas a tratamento com extrato de isoflavonas a 15%, administrado por gavagem, nas doses de 250 mg, 500 mg e 750 mg/kg/dia e observaram que o extrato utilizado induz aumento do peso uterino, sendo o aumento dependente da dose usada.

Mäkelä et al <sup>(206)</sup> reportaram ausência de atividade uterotrópica da genisteína, quando sua concentração fosse inferior a 2,5 mg/kg por dia, na alimentação de ratas castradas.

Neste estudo, a dose padronizada considerada ideal foi de 125 mg/ kg de peso/ dia de genisteína, administrada por 28 dias, estando de acordo com os achados dos outros pesquisadores.

Observou-se a reversão das alterações decorrentes da atrofia do útero nos grupos tratados com isoflavonas. Nesses grupos, houve diminuição na quantidade de núcleos, aumento das fibras colágenas e aumento do número de vasos miometriais com o tratamento precoce ou tardio à base de isoflavonas. A análise do útero foi importante, já que não se dispõe na literatura de estudo semelhante a este, no qual se avaliou a ação uretral das isoflavonas, para comparação. Mosquette et al <sup>(207)</sup> analisaram o efeito da administração de extrato de isoflavonas em ratas de três meses, ooforectomizadas, tratadas por gavagem, após 28 dias da castração, durante 21 dias. Verificou-se aumento dos vasos miometriais, bem como maiores médias de peso uterino e maior espessura miometrial, na maior dose utilizada (300mg/kg/dia) de isoflavonas, sendo a dose de 10 mg/kg/dia considerada ineficaz. Esses resultados vão de encontro aos deste trabalho.

A literatura também é bastante controversa no que se refere à atuação das isoflavonas em útero. Como citado anteriormente, outros estudos têm demonstrado que a exposição de ratas aos fitoestrógenos resulta em aumento do peso uterino <sup>(50, 154, 199-203, 205)</sup>.

Entretanto, Fanti et al <sup>(32)</sup> verificaram que o peso uterino não foi afetado pela administração de genisteína, porém a administração de 05 µg/g/dia de genisteína por via subcutânea reduziu em mais de 50% a perda de massa óssea precoce decorrente da ooforectomia. Os autores avaliaram diferentes doses de genisteína subcutânea, administrada durante 21 dias, em ratas de 60 dias (peso médio de 200g), analisando tibia e peso uterino, comparando-se com controle negativo.

Tansey et al <sup>(208)</sup> estudaram a resposta de proteínas da soja em baixas (11,6 mg de isof/1800 cal) e altas doses (117,8 mg isof/1800 cal), administradas durante dois meses em ratas

de 40 dias, ooforectomizadas, concomitante ou não aos estrogênios conjugados em baixa (0,313 mg/ 1800 cal) ou alta dose (0,625 mg/ 1800 cal), comparando com controles. Os autores observaram que o peso uterino e a citologia vaginal não foram influenciados pela dieta com proteínas da soja nas doses usadas, bem como outros parâmetros estudados, indicando ausência de efeitos estrogênicos das proteínas da soja em endométrio. Além disso, não houve evidência de efeito sinérgico das proteínas da soja com estrogênios conjugados. Notaram, também, que a resposta induzida pelos estrogênios conjugados na expressão da lactoferritina nas células epiteliais uterinas foi reduzida pelas altas doses de proteínas da soja, sugerindo que altas doses de proteínas da soja podem antagonizar efeitos de estrogênios em baixas concentrações em útero de ratas ou que pode haver resposta célula-específica em útero.

Harrison et al <sup>(209)</sup> analisaram ratas Sprague-Dawley submetidas ao tratamento com proteínas da soja, após duas semanas da castração, durante quatro semanas, e notaram supressão da perda óssea decorrente da ooforectomia, sem diminuição dos marcadores de turnover ósseo e sem efeito uterotrópico, sugerindo possíveis diferenças nos mecanismos de ação.

Além desses autores, vários outros pesquisadores que desenvolveram estudos com ratas ooforectomizadas evidenciaram redução da reabsorção óssea sem efeitos adversos em outros órgãos sensíveis ao estrogênio, como o trato reprodutivo <sup>(210, 211)</sup>.

Uma das explicações para ação no osso, mas não no útero, seria a atuação das isoflavonas por meio de mecanismos não-relacionados à ativação de receptor estrogênico. Entretanto, os mecanismos de ação não-genômicos demonstrados *in vitro* parecem não ocorrer *in vivo*, de acordo com os níveis sanguíneos alcançados pela ingestão via oral das isoflavonas.

Mathey et al <sup>(171)</sup> avaliaram a concentração sérica de genisteína em consumidores crônicos de 100 mg de isoflavonas/dia, quantidade esta maior que a habitualmente ingerida em populações com consumo regular de isoflavonas, e encontrou níveis constantes diários entre 2 e 3  $\mu\text{M}$ . Morabito et al <sup>(212)</sup> notaram concentrações séricas de genisteína ao redor de 1,5  $\mu\text{M}$  durante suplementação prolongada com doses fisiológicas desse composto. Estima-se que 1,3% da quantidade de genisteína total seja encontrada na forma livre. Portanto, tais concentrações correspondem a 20 nM de genisteína sérica não-conjugada. A concentração efetiva disponível para as células está em aproximadamente 50% da concentração total, ou seja, o impacto fisiológico de 20 nM de genisteína sérica pode ser comparado ao observado em 10 nM de genisteína *in vitro*. Todavia, os efeitos da genisteína na atividade da tirosino-quinase ou

topoisomerase II requerem concentrações micromolares. A ativação de receptores estrogênicos é o único efeito bem documentado da genisteína em concentrações nanomolares <sup>(213)</sup>.

Entretanto, parece que o fator decisivo é a dose empregada. Picherit et al <sup>(214)</sup> avaliaram a massa óssea em ratas Wistar, de 7 meses, ooforectomizadas, tratadas com isoflavonas em diferentes doses, comparando-se com controle negativo. Isoflavonas administradas na dose de 20µg/g/d foram ineficazes na prevenção da perda de massa óssea pela castração, diferente do observado nas doses de 40 e 80µg/g/d, que foram efetivas para a prevenção da perda óssea. Entretanto, a maior dose induziu também fraca atividade uterotrópica. De maneira semelhante, Uesugi et al <sup>(215)</sup> e Ishimi et al <sup>(216)</sup>, trabalhando com diferentes doses de genisteína, observaram efeito na prevenção de perda de massa óssea de ratas ooforectomizadas tratadas, com ou sem efeito uterotrópico na dependência da maior ou menor dose utilizada. RE $\alpha$  estão presentes em grandes quantidades no lume uterino, células epiteliais, células estromais, no miométrio e nas artérias do útero de ratas <sup>(184)</sup>. Isoflavonas em baixas doses não promovem ação uterina, já que predominam receptores estrogênicos do tipo alfa nesse órgão. Doses mais elevadas conseguiriam estimular estes receptores e, efetivamente, produzir efeito estrogênico. McCarty <sup>(213)</sup> refere, em sua recente revisão literária sobre isoflavonas, que níveis séricos fisiológicos de genisteína livre, alcançados por uma dieta rica em soja, conseguem ampla ativação dos receptores estrogênicos do tipo beta, mas somente mínima ou modesta ativação de receptores estrogênicos do tipo alfa.

A literatura sobre o efeito das isoflavonas no trato urinário baixo é escassa, especificamente sobre a atuação das isoflavonas em uretra de mulheres e em modelos animais de menopausa.

A atrofia urogenital decorrente da menopausa constitui importante condição pela qual passa um grande número de mulheres. Compreendem sintomas como incontinência urinária, urgência miccional, infecção urinária de repetição, prolapso genito-urinário, ressecamento vaginal, prurido, ardência e dispareunia. Sua patogênese relaciona-se à deficiência estrogênica e explica-se pela presença de receptores estrogênicos no epitélio vaginal, uretra proximal e distal, trígono vesical e no assoalho pélvico, incluindo o músculo pubo-coccígeo <sup>(217, 218)</sup>.

Tem sido referida a presença de receptores de esteróides sexuais em áreas do cérebro envolvidas no início e no controle da micção e também na fáscia pubo-cervical. Além disso, o metabolismo do tecido conjuntivo e a biossíntese do colágeno é modulada pelos esteróides ovarianos <sup>(218)</sup>. Blakeman et al <sup>(219)</sup> observaram que o estradiol aumenta proliferação epitelial em

bexiga e uretra e influencia vários parâmetros vesicais. Contudo, efeitos das isoflavonas em bexiga não têm sido publicados <sup>(220)</sup>.

A bexiga é anatômica e funcionalmente controlada pelos receptores estrogênicos, de tal forma que a incontinência urinária, sobretudo a relacionada com as alterações existentes após a menopausa, poderia ser tratada com hormônios, direta ou indiretamente. Entretanto, existe nesse órgão a predominância de receptores estrogênicos do tipo  $\beta$ , o que poderia favorecer a ação das isoflavonas em substituição à terapia hormonal. Já na uretra ocorre predomínio dos receptores estrogênicos do tipo  $\alpha$ . Porém, apesar de sua preferência pelos receptores do tipo beta, as isoflavonas poderiam atuar também na uretra. Diante dessa perspectiva, estudos são necessários no sentido de elucidar o papel das isoflavonas no trato urinário. Contudo, os resultados disponíveis na literatura são conflitantes.

Wuttke et al <sup>(220)</sup> realizaram medida do tônus vesical em ratas castradas tratadas com estradiol, soja (12,5 mg/ dia/ animal) e *Cimifuga racemosa* (CR) durante 03 meses; as menores pressões foram observadas no grupo controle (não-tratados) e as maiores, nos grupos tratados com estradiol; resposta similar foi observada com a CR e os grupos tratados com soja tiveram modestos aumentos de pressão. Concluiu-se que a bexiga é receptiva à ação estrogênica e que há um aumento significativo da atividade do detrusor em resposta ao estradiol e à CR, porém leve em resposta à soja.

Manonai et al <sup>(217)</sup> recrutaram mulheres saudáveis entre 45 e 70 anos na peri e pós-menopausa e as acompanharam por dois períodos de 12 semanas cada, em um estudo “cross-over” randomizado, para avaliar o efeito das isoflavonas nos sintomas urogenitais, tais como incontinência urinária, urgência miccional, leucorréia, dispareunia e ressecamento vaginal. Essas mulheres tiveram dieta reduzida em proteínas animais, com baixos teores de gordura e com quantidades de isoflavonas maiores do que 50 mg/ dia. Os autores concluíram que dieta rica em isoflavonas da soja não melhorou os sintomas urogenitais. Entretanto, houve piora dos sintomas de incontinência de urgência e ressecamento vaginal no grupo controle, sugerindo um possível efeito positivo das isoflavonas.

Accorsi et al <sup>(221)</sup>, em estudo prospectivo com 30 mulheres na pós-menopausa, usuárias de 100 mg/dia de extrato de soja durante seis meses, notaram aumento do número de vasos peri-uretrais e aumento da força muscular do assoalho pélvico após o tratamento.

Tomaszewski et al <sup>(218)</sup> estudaram espécimes da fásia pubovesical de mulheres na perimenopausa com incontinência urinária de esforço, retiradas durante o tratamento cirúrgico, para determinar a resposta *in vitro* dos fibroblastos ao 17 beta-estradiol e à daidzeína, usando como controle fibroblastos de pele humana. Verificaram que os fibroblastos tiveram uma capacidade de proliferação aumentada após o tratamento com 17 beta-estradiol, comparando-se com o controle, o mesmo não sendo observado em relação à daidzeína.

Na avaliação uretral desta pesquisa, o tratamento precoce com isoflavonas reverteu as alterações instituídas pela ooforectomia no número de núcleos, que diminuiu, e no número de fibras colágenas, que também foi reduzido. O mesmo não foi observado no grupo tratado tardiamente. Esses achados sugerem que as isoflavonas podem ter papel mais protetor do que terapêutico na uretra, à semelhança do que foi descrito por alguns autores no que se refere aos ossos.

Outra possível explicação para a ausência de resposta no grupo de ratas tratadas tardiamente com isoflavonas é que o tempo de tratamento pode não ter sido suficiente para reverter alterações estabelecidas de forma mais severa em virtude de maior período após a ooforectomia sem nenhum tipo de tratamento, já que se trata de um composto de fraca atividade estrogênica. As isoflavonas têm menor potência estrogênica, comparando-se com o estradiol. A afinidade aos receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$  das isoflavonas é cerca de mil vezes menor que a do estradiol (genisteína > daidzeína > biochanina A > formononetina) <sup>(222, 223)</sup>. Portanto, mesmo em altas doses, a atividade estrogênica é fraca.

Todavia, não houve diferenças entre tratamento precoce e tardio com isoflavonas no útero neste estudo. Isto poderia ser explicado pela diferença de distribuição de receptores estrogênicos nesses órgãos, havendo, talvez, maior quantidade desses receptores no útero, em comparação à uretra.

O aumento da síntese de colágeno pode ser responsável pela formação de uma matriz extracelular mais rígida, resultando na diminuição das funções mecânicas do tecido conjuntivo <sup>(225)</sup>, alterando o balanço entre a flexibilidade e a estabilidade do tecido peri-uretral. A terapia estrogênica diminui a quantidade de colágeno peri-uretral e o tamanho de suas fibras em pacientes incontinentes <sup>(226)</sup>. A estrogêniooterapia pode também influenciar em algum grau a organização espacial dos filamentos de colágeno, organização esta que pode estar alterada na incontinência urinária <sup>(224)</sup>.

Sartori et al <sup>(142)</sup> notaram que a reposição estrogênica de ratas castradas diminuiu a quantidade de fibras colágenas do detrusor e da uretra. Neste estudo, a castração aumentou o número de fibras colágenas e o tratamento precoce com isoflavonas reduziu o número de fibras colágenas uretrais em ratas, o que poderia ser atribuído à atividade estrogênica desses compostos. Pode-se inferir que esses achados estão de acordo com os de Sartori et al <sup>(142)</sup>, que estudaram a resposta ao estrogênio da uretra e do detrusor de ratas castradas. Falconer et al <sup>(226)</sup> mostraram resposta ao estrogênio semelhante no tecido peri-uretral de mulheres incontinentes na pós-menopausa, que apresentaram menor número de fibras colágenas e menor diâmetro dessas fibras, em comparação ao grupo não tratado.

O tratamento precoce com isoflavonas, nesta pesquisa, levou à diminuição do número de núcleos de células musculares e do número de fibras colágenas em uretra. Pode-se supor, então, que as isoflavonas aumentam algum outro componente da matriz extracelular na uretra de ratas castradas submetidas precocemente ao tratamento.

Este trabalho trata-se de um estudo inicial sobre a ação das isoflavonas, no trato urinário baixo, sugerindo um papel promissor na melhora dos sintomas urinários decorrentes da menopausa, porém mais estudos são necessários para que se possa chegar a conclusões definitivas.

**CONCLUSÕES**



Os achados permitem concluir que a administração oral de extrato de isoflavonas da soja em ratas adultas, ooforectomizadas, na dose de genisteína de  $125\mu\text{g/ g}$  de peso corporal/ dia:

1- Tem efeito uterotrópico.

2- Diminui o número de núcleos celulares de fibras musculares e de fibras colágenas na uretra, no grupo tratado precocemente, enquanto que a administração tardia não reverte as alterações advindas da castração na uretra de ratas.



**Anexo 1:** Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em pesquisa da  
UNIFESP-EPM.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 10 de outubro de 2003  
CEP Nº 1103/03

Ilmo(a) Sr.(a)

Pesquisador(a): ELAINE TRAVAGLIA SANTOS

Disciplina/Departamento: Ginecologia

Ref.: Projeto de Pesquisa:

Análise da mucosa dos vasos sanguíneos do colágeno e das fibras musculares da bexiga e da uretra de ratas castradas, antes e durante a administração de isoflavonas

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo em reunião, **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima.

O relatório parcial está previsto para 07/04/04

Atenciosamente,



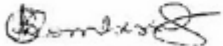
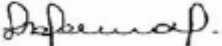
**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

**Anexo 2:** Ração especial para roedores, isenta de soja, utilizada no estudo.

| Concentrado           |            | Fórmula "LABINA" Especial para ROEDORES |               | Consumo (ton) |           | 1,000 |  |
|-----------------------|------------|---|---------------|---------------|-----------|-------|--|
| <b>Comentários</b>    |            |   |               |               |           |       |  |
| Alimentos             | %          | Batida (kg)                             | Consumo (ton) |               |           |       |  |
| FARINHA PEIXE 49%     | 3,000      | 30,000                                  | 0,030         |               |           |       |  |
| SAL COMUM             | 0,700      | 7,000                                   | 0,007         |               |           |       |  |
| LEITE PO INTEGRAL     | 4,000      | 40,000                                  | 0,040         |               |           |       |  |
| CALCARIO 36%          | 2,000      | 20,000                                  | 0,020         |               |           |       |  |
| FOSFATO BICALCICO 18% | 0,600      | 6,000                                   | 0,006         |               |           |       |  |
| MILHO, FUBÁ           | 20,700     | 207,000                                 | 0,207         |               |           |       |  |
| PREMIX PURINA         | 1,000      | 10,000                                  | 0,010         |               |           |       |  |
| TRIGO, FARELO         | 42,700     | 427,000                                 | 0,427         |               |           |       |  |
| GLUTENOSE/PROTENOSE   | 25,300     | 253,000                                 | 0,253         |               |           |       |  |
| Matéria Seca (MS)     | 88,8127 Kg | Proteína (PB)                           | 26,0000 %     | NDT (NOT)     | 74,5001 % |       |  |
| Cálcio (Ca)           | 1,2000 %   | Fósforo (P)                             | 0,9000 %      | Sal (Sal)     | 0,7000 %  |       |  |
| Fibra (FB)            | 5,3532 %   | Gordura (Gord)                          | 4,1430 %      | C.N.E. (CNE)  | 29,4731 % |       |  |
| Sódio (Na)            | 0,3122 %   |   |               |               |           |       |  |

**Anexo 3:** Certificado de análise do extrato de isoflavonas utilizado no estudo.

|  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|
|   |  | <h1>SP FARMA</h1>  |  |   |  |
| <b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>  |  |  |  |  |  |
| <p>Este é o seu Certificado de Análise SP FARMA. Com ele, você tem a garantia de que este produto está de acordo, ou excede às especificações estabelecidas pela United States Pharmacopeia ou pela British Pharmacopeia.</p>  |  |  |  |  |  |
| <b>ISOFLAVONAS 40%</b>   |  |  |  |  |  |
| <b>Lote</b> : 20030219<br><b>Origem</b> : CHINA<br><b>Fabric.</b> : 01/02/2003<br><b>Peso Molec</b> : 222,24   |  | <b>Análise</b> : 12/04/2003<br><b>Validade</b> : 01/02/2005<br><b>DCB/DCI</b> :<br><b>Form Molec</b> : C15H10O2  |  |  |  |
| <b>Análises Realizadas pela SP Farma</b>   |  |  |  |  |  |
| <b>Teste Realizado</b><br>Características Organolépticas<br>Solubilidade<br>Perda por Secagem<br>Densidade Bulk<br>Identificação   |  | <b>Especificação</b><br>Pó bege com odor característico<br>-<br>Não mais que 6%<br>-<br>Positiva   |  | <b>Resultado Obtido</b><br>De acordo<br>praticamente insolúvel em água e etanol.<br>0,02%<br>0,0605 g/mL<br>HPLC   |  |
| <b>Análises Realizadas pelo Fabricante</b>   |  |  |  |  |  |
| <b>Teste Realizado</b><br>Perda por Secagem<br>Teor - Isoflavonas<br>Tamanho de partícula<br>Contagem total de pratos<br>Bolores e Leveduras<br>E. coli, Salmonella<br>Genistina e Genisteína<br>Glicitina e Gliciteína<br>Daidzina e Daidzeína<br>Metais Pesados<br>Arsênio |  | <b>Especificação</b><br>Não mais que 6%<br>Não menos que 40,0%<br>-<br>Não mais que 1.000 UFC/g<br>Não mais que 100 UFC/g<br>Ausente<br>-<br>-<br>-<br>Não mais que 20 ppm<br>Não mais que 1 ppm |  | <b>Resultado Obtido</b><br>2,15%<br>42,55%<br>menor que 80 mesh<br>conforme<br>conforme<br>Ausente<br>7,29% // 8,15%<br>0,69% // 0,23%<br>7,0% // 19,19%<br>conforme<br>conforme |  |
| <b>ARMAZENAR EM RECIPIENTE HERMETICAMENTE FECHADO</b><br><b>MANTER EM LOCAL SECO E FRESCO</b><br>Fator de Correção : 2,5   |  |  |  |  |  |
| <br><b>Cristiane B. Rombesso</b><br>Química da Qualidade  |  | <br><b>Leticia Rita Rezende</b><br>Farmacêutica Resp. CRF : 16114-SP  |  |  |  |
| <b>Data de Emissão : 09/06/2003</b>  |  |  |  |  |  |
| Mantenha este Certificado em seus arquivos para facilitar consultas eventualmente necessárias.<br>Informações complementares, contatar nosso Depto. Técnico pelo fone : (0XX11) 5561-6513  |  |  |  |  |  |

**Referências bibliográficas**

1. Yabur, JA. La menopausia puesta al día. *Gac méd Caracas* 2006;114(1):1-12.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – Comunicação Social de 25 de julho de 2002.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – Comunicação Social de 30 de agosto de 2005.
4. World Health Organization. Core Health Indicators – mortality. *World Health Statistics* 2007, third edition.
5. Hachul de Campos H, Bittencourt LRA; Haidar MA, Tufik S, Baracat EC. Distúrbios do Sono no Climatério. *Femina* 2005;33(11):815-20.
6. Baracat EC, Haidar MA, Rodrigues de Lima G. Síndrome do climatério. *Ars Curandi* 1991;24(8):9-16.
7. Eichholz AC, Mahavni V, Sood AK. Allopathic and complementary alternatives to hormone replacement therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3(7):949-55.
8. Coxam V. New advances in osteoporosis nutritional prevention. *Med Sci (Paris)* 2005;21(3):297-301.
9. Castelo-Branco C e Rostro F. Management of menopause. *Minerva Ginecol* 2006;58(2):137-52.
10. Ferreira JAS. A perimenopausa. In: Fernandes CE, Melo NR, Wheba S. *Climatério feminino*. São Paulo: Ed. Lemos; 1999. p.41-56.
11. Navarro PAAS, Gomes FM, Azevedo GD, Costa FS, Ferriani RA, Iannetta O. Fatores locais envolvidos na etiopatogênese da osteoporose pós-menopausa. *Reprod Clim* 2001;16:167-72.
12. Parente, RCM. A relação entre o fumo e a idade da menopausa: uma revisão sistemática. [tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2007. 80 p.
13. Tapiero H, Ba GN, Tew KD. Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother* 2002;56:36-44
14. Ewies AA. Phytoestrogens in the management of the menopause: up-to-date. *Obstet Gynecol Surv* 2002; 57(5): 306-13.
15. Fitzpatrick LA. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal women. *Mayo Clin Proc* 1999; 74(6): 601-7.
16. Ryan-Borchers TA; Park JS; Chew BP; McGuire MK; Fournier LR; Beerman KA. Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2006;83(5):1118-25.
17. Rodrigues de Lima G, Baracat EC, Wehba S. Climatério: Terapêutica. In: Rodrigues de Lima G e Baracat EC. *Ginecologia Endócrina*. São Paulo. 1ª ed. Atheneu, 1995.

18. Baracat EC, Lima GR. Guia de ginecologia. São Paulo: Manole; 2005. p 339-43. (Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar).
19. Geller SE e Studee L. Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what does not. *J Womens Health (Larchmt)* 2005;14(7):634-49.
20. Garai J. Hepatic dysfunction in development of menopausal hot flushes? *Med Hypotheses* 2002;58(6):535-9.
21. Girão MJBC e Sartori MGF. Síndrome do climatério – alterações do trato urinário inferior. In: Rodrigues de Lima G e Baracat EC. *Ginecologia Endócrina*. São Paulo. 1. ed. Atheneu, 1995, p.271-2.
22. Baracat EC, Sartori MGF, Haidar MA, Girão MJBC, Rodrigues de Lima G. Alterações urogenitais no climatério. In: Girão MJBC, Rodrigues de Lima G, Baracat EC – *Uroginecologia*. São Paulo. 1. ed. Artes Médicas. 1997. p.91-8.
23. Punyahotra S, Dennerstein L, Lehert P. Menopausal experiences of Thai women. Part 1: Symptoms and their correlates. *Maturitas* 1997;26:1–7.
24. Punyahotra S, Dennerstein L. Menopausal experiences of Thai women. Part 2: The cultural context. *Maturitas* 1997;26:9–14.
25. Kessel B. Alternatives to estrogen for menopausal women. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:38–44.
26. Tinelli A, Perrone A, Tinelli FG. An alternative to postmenopausal Hormone Replacement Therapy? Selective Estrogens Receptors Modulators (SERMs). *Minerva Ginecol* 2001; 53(2):127-35.
27. Cheng G, Wilczek B, Warner M, Gustafsson JA, Landgren BM. Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause* 2007;14(3 Pt 1):468-73.
28. Consensus – International Menopause Society, 2007. Recomendações para a terapia hormonal no climatério. *J Sobrac* 2007; ano XIV(1):5-6.
29. Geller SE e Studee L. Soy and red clover for mid-life and aging. *Climateric* 2006; 9(4): 245-63.
30. Hammar M, Nedstrand E, Wyon Y. Few alternatives to estrogen replacement therapy for vegetative symptoms after menopause. *Lakartidningen* 2004;101(18):1612-6.
31. Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A. Phyto-oestrogens: Where are we now? *Br J Nutr* 1998;79(5):393–406.
32. Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 1998;8(3):274-81.



33. Lissin LW e Cooke JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(6):1403-10.
34. Rees M e Purdie D. Non-hormone replacement therapy options and alternative therapies. *Management of the Menopause: The Handbook of the British Menopause Society*, 2. Ed. Marlow: BMS Publications Ltd, 1999, pp 42–9.
35. Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, Andò S. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2001;60(3):595-602.
36. Maskarinec G, Singh S, Meng L, Franke AA. Dietary soy intake and urinary isoflavone excretion among women from a multiethnic population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:613-9.
37. Davis SR. Phytoestrogen therapy for menopausal symptoms? *BMJ* 2001; 323:354-5
38. Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 1994;21:113-31.
39. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Emster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a metanalysis. *Obstet Gynecol* 1995;85:305-13.
40. Adlercreutz H. Western diet and western disease: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50 (Suppl 201):3-23
41. Xu X, Duncan AM, Merz BE, Kurzer MS. Effect of soy isoflavonas on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:1101-08.
42. Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F, Gatti E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J Nutr* 1995; 125:598S-605S.
43. Adlercreutz H, Amalainem E, Gorbach S, Goldin B. Dietary phytoestrogens and menopause in Japan. *Lancet* 1992; 339(8803):1233.
44. Hirano T, Fukuoka K, Oka K, Naito T, Hosaka K, Mitsuhashi H, Matsumoto Y. Antiproliferative activity of mammalian lignan derivatives against the human breast carcinoma cell line, ZR-75-1. *Cancer Invest* 1990;8(6):595–602.
45. Jha HC, von Recklinghausen G, Zilliken F. Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem Pharmacol* 1985;34:1367–69.
46. Hirano T, Oka K, Akiba M. Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR- 75-1. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989;64:69–78.
47. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(7):2690–94.

48. Dailey RK, Neale AV, Northrup J, West P, Schwartz KL. Herbal product use and menopause symptom relief in primary care patients: a MetroNet study. *J Womens Health (Larchmt)* 2003;12(7):633-41.
49. Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 2003;44 Suppl1:S21-9.
50. McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Edwards JA, Baush J. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem Toxicol* 2006;44(1):56-80.
51. Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal* 1946;22:2-12.
52. Adams NR. Organizational and activational effects of phytoestrogens on reproductive tract of the ewe. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:87-91.
53. Nwannenna AI, Lundh TJ, Madaj A, Frederikssen G, Björnhag G. Clinical changes in ovariectomized ewes exposed to phytoestrogens and 17 $\beta$ -estradiol implants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:92-7.
54. Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 1984;40:569-78.
55. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical review 97: Potencial health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2223-35.
56. Setchell KD. Soy isoflavonas – benefits and risks from nature’s seletive estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 2001;20:354S-383S.
57. Stark A e Madar Z. Phytoestrogens: a review of recent findings. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15(5):561-72.
58. Bedani R e Rossi EA. Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. *Bol. Centro de Pesqui. Process. Aliment* 2005;23(2):231-64.
59. Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J Nutr Biochem* 2000;11:326-31.
60. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer* 1991;16:43-52.
61. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:297-303.
62. Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garner SC. Health potential of soy isoflavonas for menopausal women. *Public Health Nutr* 1999;2:489-504.
63. Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods: USDA – United States Department of Agriculture, 1999.

64. Nachtigall L. Isoflavones in the management of menopause. *J Br Menopause Soc* 2001;(Suppl 1):8-11
65. Wender MC e Campos LS. Fitoestrogênios: examinando as evidências do seu emprego no climatério. *Reprod Clim* 2001;16:155-62.
66. Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn, L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon<sup>®</sup>) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78:67-75.
67. Alves DL, Silva CR. Fito-hormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu; 2002 p.1-54.
68. Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala K. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:18-26.
69. Price KR e Fenwick GR. Naturally occurring oestrogens in foods – a review. *Food Addit Contam* 1985;2:73-106.
70. Kelly GE, Joannou GE, Reeder AY, Nelson C, Waring MA. The variable metabolic response to dietary isoflavonas in humans. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208: 40-3.
71. Barnes S, Sfakianos J, Coward L, Kirk M. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv Exp Med Biol* 1996;401:87–100.
72. Setchell KD e Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 1999;129(3):758S-767S.
73. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986;231:1150-4.
74. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925-30.
75. Clapauch R, Meirelles RMR, Julião MASG, Loureiro CKC, Giarodoli PB, Pinheiro AS, Harrigan AR, Spritzer PM, Pardini DP, Weiss RV, Athayde A, Russo LA, Póvoa LC. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(6):679-95.
76. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventós RM. Isoflavones, lignans, and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1044-62.
77. Jones KP. Menopause and cognitive function: estrogens and alternative therapies. *Clin Obstet Gynecol* 2000;43:198–206.
78. Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurrpide E. In vitro bioassays of nonsteroidal phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;45(5):399–405.

79. Collins BM, McLachlan JA, Arnold SF. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 1997;62:365–72.
80. Barnes S, Peterson TG, Coward L. Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *J Cell Biochem* 1995;22(Suppl):181-87.
81. De Kleijn MJ, Van Der Schouw YT, Wilson PW, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE, Jacques PF. Intake of dietary phytoestrogen is low in post-menopausal women in the United States; the Framingham study. *The Journal of Nutrition* 2001;131:1826-32.
82. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe, SH, Van Der Saag PT, Van Der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol* 1998;139: 4252-63.
83. Paech K, Webb P, Kuipper GGJ, Nilsson S, Gustafsson JÁ, Kushner PJ; Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER and ER $\beta$  at API sites. *Science* 1997;227:1508-10.
84. Consensus (authors not available). The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of The North American Menopause Society. *Menopause* 2000;7:215-29.
85. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3):863–70.
86. Morito K; Aomori T; Hirose T; Kinjo J; Hasegawa J; Ogawa S; Inoue S; Muramatsu M; Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull* 2002; 25(1):48-52.
87. Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-Usmar V. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxyl radical scavenging. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1570-81.
88. Baum JA Teng H, Erdman JW Jr , Weigel RM, Klein BP, Persky VW, Freels S, Surya P, Bakhit RM, Ramos E, Shay NF Potter SM. Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *AM J Clin Nutr* 1998; 68: 545-51.
89. Crouse JR<sup>3rd</sup>, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2070-76.
90. Nestel PJ, Pomeroy S, Kay S, Komesaroff P, Behrsing J, Cameron JD, West L. Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84: 895-8.
91. Merz-Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, pré-menopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1462-69.

92. Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang YL, Davis S, McGrath BP. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3053-60.
93. Van der Schouw YT; Pijpe A; Lebrun CE; Bots ML; Peeters PH; van Staveren WA; Lamberts SW; Grobbee DE. Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(8):1316-22.
94. Wu J, Oka J, Higuchi M, Tabata I, Toda T, Fujioka M, Fuku N, Teramoto T, Okuhira T, Ueno T, Uchiyama S, Urata K, Yamada K, Ishimi Y. *Metabolism* 2006;55(4):423-33.
95. Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *J Nutr* 1998;128:728-32.
96. Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Celermajer DS. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2000;85:1297-301.
97. Scambia G, Mango D, Signorile PG, Anselmi Angeli RA, Palena C, Gallo D, Bombardelli E, Morazzoni P, Riva A, Mancuso S. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. *Menopause* 2000;7:105-11.
98. Upmalis DH, Lobo R, Bradley L, Warren M, Cone FL, Lamia CA. Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in post-menopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*;7:236-242, 2000
99. Törmälä RM; Nikander E; Tiitinen A; Väisänen-Tommiska M; Ylikorkala O; Mikkola TS. *Menopause* 2006;13(1):96-101.
100. Lock M. Anthropological approaches to menopause: questioning received wisdom. Introduction. *Cult Med Psychiatry* 1986;10:1-5.
101. Murkies AL, Lombard C, Strauss BJ, Wilcox G, Burger HG, Morton MS. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. *Maturitas* 1995;21:189-95.
102. Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol* 1998;91:6-11.
103. Seidl MM e Stewart DE. Alternative treatments for menopausal symptoms. Systematic review of scientific and lay literature. *Can Fam Phys* 1998;44:1299-1308.
104. Chung TK, Yip SK, Lam P, Chang AM, Haines CJ. A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study on the effect of oral oestradiol on acute menopausal symptoms. *Maturitas* 1996;25:115-23.

105. Baird DD, Umbach DM, Lansdell L, Hughes CL, Setchell KD, Weinberg CR, et al. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1685-90.
106. Wei H. Photoprotective action of isoflavone genistein: models, mechanisms, and relevance to clinical dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:271-2.
107. Cai Q e Wei H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer* 1996;25:1-7.
108. Casini ML; Marelli G; Papaleo E; Ferrari A; D'Ambrosio F; Unfer V. *Fétil Steril* 2006;85(4):972-8.
109. Kritz-Silverstein D, Von Muhlen D, Barret-Connor E, Bressel MA. Isoflavones and cognitive function in older women: the Soy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study. *Menopause* 2003;10:196-202.
110. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. Dietary Soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 1996; 126:161-7.
111. Picherit C; Coxam V; Bennetau-Pelissero C; Kati-Coulibaly S; Davicco MJ; Lebecque P; Barlet JP. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 2000;130(7):1675-81.
112. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1375S-1379S.
113. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000;72:844-52.
114. Wangen KE, Duncan AM, Merz-Demlow BE et al. Effects of soy isoflavonas on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3043-48.
115. Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1093-100.
116. Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet* 1997;350: 990-4.
117. Murkies A, Dalais FS, Briganti EM, Burger HG, Healy DL, Wahlqvist ML, Davis SR. Phytoestrogens and breast cancer in postmenopausal women: a case control study. *Menopause* 2000;7(5):289-96.
118. Lee YH; Hyun SH; Choung SY. Effect of herbal extract mixture on menopausal urinary incontinence in ovariectomized rats. *Biofactors* 2006; 26(3): 171-8.

119. Kobata, SA. Dopplervelocimetria dos vasos peri-uretrais de mulheres na pós-menopausa com incontinência urinária de esforço, antes e durante o uso de estrogênio-terapia intravaginal [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002. 96 p.
120. Wall LL. The muscles of the pelvic floor. *Clin Obstet Gynecol* 1993;36(4):910-25.
121. Rud T, Andersson KE, Asmussen M, Hunting A, Ulmsten U. Factors maintaining the intraurethral pressure in women. *Invest Urol* 1980;17(4):343-7.
122. Cardozo L. Role of estrogens in the treatment of female urinary incontinence. *J Am Geriatr Soc* 1990;38:326-8.
123. Carlile A, Davies J, Rigby A, Brocklehurst JC. Age changes in the human female urethra: a morphometric study *J Urol* 1988;139:532-5.
124. Raz S, Caine M, Zeigler M. The vascular component in the production of intraurethral pressure. *J Urol* 1972;108:93-6.
125. Iosif CS, Batra S, Ek A, Astedt B. Estrogen receptors in the human female lower urinary tract. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:817-20.
126. DeLancey JOL e Starr RA. Histology of the connection between vagina and levator ani muscles. Implications for urinary tract function. *J Reprod Med* 1990;35(8):765-71.
127. Batra SC e Iosif CS. Female urethra: a target for estrogen action. *J Urol* 1983;129:418-20.
128. Batra SC e Iosif CS. Progesterone receptors in the female lower urinary tract. *J Urol* 1987;138(5):1301-4.
129. Ingelman-Sundberg A, Rosén J, Gustafsson SA, Carltröm K. Cytosol estrogen receptors in the urogenital tissues in stress-incontinent women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1981;60:585-6.
130. Schreiter F, Fuchs P, Stockamp K. Estrogenic sensitivity of alpha-receptors in the urethra musculature. *Urol Int* 1976;31:13-9.
131. Callahan SM e Creed KE. The effects of oestrogens on spontaneous activity and responses to phenylephrine of the mammalian urethra. *J Physiol* 1985;358:35-46.
132. Ostergard DR. Embriology and anatomic of female bladder and urethra. In: Ostergard DR e Bent AE (eds) – *Urogynecology and Urodynamics: Theory and practice*. 3a ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 3-31.
133. Rekers H, Drogendijk AC, Valkenburg H, Riphagem F. Urinary incontinence in women from 35 to 79 years of age: prevalence and consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;43:229-34.
134. Lindskog M, Sjögren C, Andersson KE, Ulmsten U. Oestrogen binding sites in nuclear fractions from the rat urogenital tract. *Acta Pharm Toxicol* 1982;50:238-40.

135. Wilson PD, Barker G, Barnard RJ, Siddle NC. Steroid hormone receptors in the female lower urinary tract. *Urol Int* 1984;39:5-8.
136. Wolf H, Wandt H, Jonat W. Immunohistochemical evidence of estrogen and progesterone receptors in the female lower urinary tract and comparison with the vagina. *Gynecol Obstet Invest* 1991;32:227-31.
137. Pacchioni D, Revelli A, Casetta G, Cassoni P, Piana P, Tizzani A et al. Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the normal urinary bladder and in pseudomembranous trigonitis. *J Endocrinol Invest*. 1992;15(10):719-25.
138. Rechberger T, Donica H, Baranowski W, Jakowicki J. Female urinary stress incontinence in terms of connective tissue biochemistry. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 1993;49:187-91.
139. Smith P, Heimer G, Norgren A, Ulmsten U. Localization of steroid hormone receptors in the pelvic muscles. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 1993;50:83-5.
140. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia – FEBRASGO – Manual de Orientação – Uroginecologia e Cirurgia Vaginal. Disponível em <http://www.febrasgo.org.br/> Acessado em set de 2007.
141. Fernandes, Cesar Eduardo; Morita, Maria Helena; Ferreira, Jose Arnaldo de Souza; Silva, Edson Possebon da; Wehba, Salim. Abordagem dos distúrbios do trato urinário na mulher pós-menopausada. *Rev Paul Med* 1990;108(5): 230-5.
142. Sartori MGF, Girão MJBC, de Jesus Simões M, Sartori JP, Baracat EC, Rodrigues de lima G. Quantitative evaluation of collagen and muscle fibers in the lower urinary tract of castrated and under-hormone replacement female rats. *Clin Exp Obst Gyn* 2001;28;92-6.
143. Souza AZ. Stress incontinence of urine. *Int Surg* 1976; 61:396-402.
144. Wyman JF. Nursing assessment of the incontinent geriatric outpatient population. *Nurs Clin North Am* 1988;23;160–87.
145. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(1):116-26.
146. Zinner NR, Sterling AM, Ritter RC. Role of inner urethral softness in urinary continence. *Urol* 1980;16:115-7.
147. Miodrag A, Castleden CM, Vallance TR. Sex and the female urinary tract. *Drugs* 1988; 36:491-504.
148. Fantl JA, Cardozo L, McClish DK. Estrogen therapy in the management of urinary incontinence in postmenopausal women: a meta-analysis. First report of the Hormones and Urogenital Therapy Committee. *Obstet Gynecol* 1994;83(1):12-8.



149. Suguita M, Girão MJBC, Simões MJ, Sartori MGF, Baracat EC, Rodrigues de Lima G. A morphologic and morphometric study of the vesical mucosa and urethra of castrated female rats following estrogen and/or progesterone replacement. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2000;27(3-4):176-8.
150. Endo RM, Girão MJBC, Sartori MGF, Simões MJ, Baracat EC, Rodrigues de Lima G. Effect of estrogen-progesterone hormonal replacement therapy on periurethral and bladder vessels. *Int Urogynecol J* 2000;11:120-3.
151. De Deus JM, Girão MJBC, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, Dietrich CP. Glicosaminoglycan profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progesterone, and raloxifene. *AmJ Obstet Gynecol* 2003;189(6):1654-9.
152. Ratz PH, McCammon KA, Altstatt D, Blackmore PF, Shenfeld OZ, Schlossberg SM. Differential effects of sex hormones and phytoestrogens on peak and steady state contractions in isolated rabbit detrusor. *J Urol* 1999;162(5):1821-8.
153. Farmakalidis E, Hathcock JN, Murphy PA. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. *Food Toxicol* 1985;23:741-5.
154. Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr* 1997;127:263-9.
155. Diel P, Smolnikar K, Schulz Y, Laudenschlager U, Michna H, Vollmer G. Phytoestrogens and carcinogenesis – differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. *Hum Reprod* 2001;16(5):997-1006.
156. Masson P. *Tumeurs humaines histologie diagnostics et techniques*. 2<sup>a</sup> ed. Paris, Librairie Maloine 1956, p 1061-148.
157. Weibel RR; Kistler GS; Scherle WF. Practical Stereological method for morphometrical cytology. *J Cell Biol* 1966;30: 23-8.
158. Barret J. Phytoestrogens: Friends or foes? *Environmental Health Perspectives* 1996; 104, 478-82.
159. Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 2001; 131: 1362S-1375S.
160. Gallo D, Zannoni GF, Apollonio P, Martinelli E, Ferlini C, Passetti G, Riva A, Morazzoni B, Bombardelli E, Scambia G. Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. *Menopause* 2005;12(5):589-600.
161. Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural Food Chemistry*; 42, 1674-1677, 1994a.

162. Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*; 42, 1666-1673, 1994b.
163. Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. The antitumoral isoflavones genistein and daidzein in soybean food of American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 1993;41:1961-7.
164. Hutchins AM, Slavin JL, Lampe JW. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J Am Diet Assoc* 1995; 95: 545-51.
165. Hutchins AM, Lampe JW, Martini MC, Campbell DR, Slavin JL. Vegetables, fruits, and legumes: effect on urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion. *J Am Diet Assoc* 1995; 95: 769-74.
166. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001; 8: 797-807
167. Axelson M, Kirk DN, Farrant RD, Cooley G, Lawson AM, Setchell KD. The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem J* 1982;201(2):353-7.
168. Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 2002;132(12):3577-84.
169. Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 1998;68(6 Suppl):1333S-1346S.
170. Axelson M, Sjövall J, Gustafsson BE, Setchell KD. Soya—a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* 1984;102(1):49-56.
171. Mathey J, Lamothe V, Coxam V, Potier M, Sauvant P, -Pelissero CB. Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41(3):957-65.
172. Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS. Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(6):581-6.
173. Setchell KD, Brown NM, Desai PB, Zimmer-Nechimias L, Wolfe B, Jakate AS, Creutzinger V, Heubi JE. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr* 2003;133(4):1027-35.
174. Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 2000; 36: 27-32.
175. Gregg DW, Galkin M, Gorski J. Effect of estrogen on the expression of galanin mRNA in pituitary tumor-sensitive and tumor-resistant rat strains. *Steroids* 1996;61:468-72.

176. Poulet FM, Roessler ML, Vancutsem PM. Initial uterine alterations caused by developmental exposure to tamoxifen. *Reproductive Toxicology* 1997;11:815-22.
177. Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* 1998;139:2741-47.
178. Spearow JL, Doemeny P, Sera R, Leffler R, Barkley M. Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science* 1999;285:1259-61.
179. Nakai M, Uchida K, Teuscher C. The development of male reproductive organ abnormalities after neonatal exposure to tamoxifen is genetically determined. *Journal of Andrology* 1999;20:626-34.
180. Long X, Steinmetz R, Ben-Jonathan N, Caperell-Grant A, Young PCM, Nephew KP, Bigsby RM. Strain differences in vaginal responses to the xenoestrogen bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 2000;108:243-47.
181. Yin H, Fujimoto N, Maruyama S, Asano K. Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats. *Japanese Journal of Cancer Research* 2001;92:1034-40.
182. Spearow JL e Barkley M. Reassessment of models used to test xenobiotics for oestrogenic potency is overdue. *Human Reproduction* 2001;16:1027-29.
183. Bailey JA e Nephew KP. Strain differences in tamoxifen sensitivity of Sprague-Dawley and Fisher 344 rats. *Anticancer Drugs* 2002;13:939-47.
184. Nakai M, Cook L, Pyter LM, Black M, Sibona J, Turner RT, Jeffery EH, Bahr JM. Dietary soy protein and isoflavones have no significant effects on bone with potential negative effect on the uterus of sexually mature intact Sprague-Dawley female rats. *Menopause* 2005; 12(3):291-8.
185. Nakai M, Black M, Jeffery EH, Bahr JM. Dietary soy protein and isoflavonas: no effect on the reproductive tract and minimal positive effect on bone resorption in the intact female Fischer 344 rat. *Food Chem Toxicol* 2005;43:945-9.
186. Couse JF, Lindzeu J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor a (Era) and estrogen receptor b (Erb) messenger ribonucleic acid in the wild-type and Era-Knockout mouse. *Endocrinology* 1997; 138:4613-21.
187. Gustafsson JA. Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2(4):508-11.
188. Utsunomiya H, Suzuki T, Harada N, Ito K, Matsuzaki S, Konno R, Sato S, Yajima A, Sasano H. Analysis of estrogen receptor alpha and beta in endometrial carcinomas: correlation with ER beta and clinicopathologic findings in 45 cases. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19(4):335-41.
189. Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 2001;24(4):351-6.

190. Lipsett MB. Hormônios esteróides. In: Yen SSC, Jaffe RB. *Endocrinologia reprodutiva: fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico*. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca; 1999. p.135-47.
191. Urbanetz AA e Ribeiro MC. Fitoestrogênios: verdade ou mito? *Reprod Clim* 2001;16:92-7.
192. Mueller SO, Simon S, Chac K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (Eralpha) and Erbata in human cells. *Toxicol Sci* 2004;80(1):14-25.
193. Boersma BJ, Barnes S, Kirk M, Wang CC, Smith M, Kim H, Xu J, Patel R, Darley-Usmar VM. Soy isoflavonoids and cancer – metabolism at the target site. *Mutat Res.* 2001;480-481:121-7
194. Lian Z, Niwa K, Tagami K, Hashimoto M, Gao, J, Yokoyama Y, Mori H; Tamaya T. Preventive effects of isoflavones, genistein and daidzein, on estradiol-17b-related endometrial carcinogenesis in mice. *Jpn J Cancer Res* 2001;92(7):726-34.
195. Naftolin F e Guadalupe Stanbury M. Phytoestrogens: are they really estrogen mimics? *Fertil Steril* 2002;77:15-7.
196. Yang NN, Venugopalan M, Hardikar S, Glasebrook A. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and raloxifene. *Science* 1996;273:1222-5.
197. Cheskis BJ, Karathanasis S, Lyttle CR. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J Biol Chem* 1997;272:11384-91.
198. Jordan VC, Koch R, Bain RR. Prolactin synthesis by cultured rat pituitary cells: An assay to study estrogens, antiestrogens and their metabolites in vitro. In: McLachlan JA, ed. *Estrogens in the environment II: influences on development*. Proceedings of the symposium, Estrogens in the environment-influences on development, Raleigh, North Carolina, United States, April 10-12, 1985. New York:Elsevier, 1985. p.221-37.
199. Cheng EW, Yoder L, Story CD, Burroughs W. Estrogenic activity of some naturally occurring isoflavonas. *Ann N Y Acad Sci* 1953;61:652-9.
200. Bickoff EM, Livingston AL, Henrickson AP, Booth AN. Relative potencies of several estrogen-like compounds found in forages. *J Agric Food Chem* 1962;10:410-2.
201. Folman Y, Pope GS. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein, and other utero-vaginitrophic compounds of low potency. *J Endocrinol* 1966;34:215-25.
202. Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB e Heck HA. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genestein and daidzeína with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol Sci* 1999;51:236-44.
203. Saloniemi H, Wahala K, Nykanen-Kurki P, Kallela K, Saastamoinem I. Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:13-7.

204. Okazaki K, Okazaki S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Wakabayashi S, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M. A repeated 28 day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the “Enhanced OECD Test Guideline 407” for screening endocrine-disrupting chemicals. *Archives of Toxicology* 2002;76:553–9.
205. Burdette JE, Liu J, Lantvit D, Lim E, Booth N, Bhat KP, Hedayat S, Van Breemen RB, Constantinou AL, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Bolton JL. *Trifolium pretense* (red clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 2002;132(1):27-30.
206. Mäkelä S, Savolainen H, Aavik E, Myllärniemi M, Strauss L, Taskinen E, Gustafsson JA, Häyry P. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(12):7077-82.
207. Mosquette Rejane; Gomes, Milena Pires de Campos Luciano; Simões, Ricardo Santos; Haidar, Mauro Abi; Simões, Manuel de Jesus; Soares Júnior, José Maria; Baracat, Edmund Chada. Efeitos das isoflavonas sobre o miométrio de ratas adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2006;28(4):227-31.
208. Tansey G, Hughes CL, Cline JM, Krümmer A, Walmer DK, Schmoltzer S. Effects of dietary soybean estrogens on the reproductive tract in female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217(3):340-4.
209. Harrison E, Adjei A, Ameho C, Yamamoto S, Kono S. The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1998;44(2):257-68.
210. Setchell KD and Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3Suppl):593S-609S.
211. Bahr JM, Nakai M, Riviera A, Walsh J, Evans GL, Lotinum S, Turner RT, Black M, Jeffery EH. Dietary soy protein and isoflavonas: minimal beneficial effects on bone and no effects on the reproductive tract of sexually mature ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 2005;12(2):165-73.
212. Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. Effects of genistein and hormonereplacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 2002;17(10):1904–12.
213. McCarty MF. Isoflavones made simple – Genistein’s agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Med Hypotheses* 2006;66(6): 1093–114.
214. Picherit C; Chanteranne B; Bennetau-Pelissero C; Davicco MJ; Lebecque P; Barlet JP; Coxam V. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *Br J Nutr*;85(3):307-16, 2001 Mar.

215. Uesugi T; Toda T; Tsuji K; Ishida H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol Pharm Bull*;24(4):368-72, 2001 Apr.
216. Ishimi Y; Arai N; Wang X; Wu J; Umegaki K; Miyaura C; Takeda A; Ikegami S. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun*;274(3):697-701, 2000 Aug 11.
217. Manonai J, Songchitsomboon S, Chanda K, Hong JH, Komindr S. The effect of a soy-rich diet on urogenital atrophy: A randomized, cross-over trial. *Maturitas* 2006;54(2):135-40.
218. Tomaszewski J, Adamiak A, Skorupski P, Rzeski W, Rechberger T. Effect of 17 beta-estradiol and phytoestrogen daidzein on the proliferation of pubocervical fascia and skin fibroblasts derived from women suffering from stress urinary incontinence. *Ginekol Pol* 2003;74(10):1410-4.
219. Blakeman PJ, Hilton P, Bulmer JN. Cellular proliferation in the female lower urinary tract with reference to oestrogen status. *Int J Obstet Gynaecol* 2001;108:813-6.
220. Wuttke W; Jarry H; Becker T; Schultens A; Christoffel V; Gorkow C; Seidlová-Wuttke D. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 2003;44 Suppl 1:S9-S20.
221. Accorsi LAS, Haidar MA, Simões RS, Accorsi Neto AC, Mosquette R, Soares Junior JM, Baracat EC. Efeitos das isoflavonas sobre o assoalho pélvico e a vascularização peri-uretral de mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2006;28(9):545-50.
222. Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu G, Van Btreemen RB, Bhat KP, Booth N, Constantinou AI, Pezzuto JM, Fong HH, Farnsworth NR, Bolton JL. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* 2001; 49:2472-9.
223. Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genisteína: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 1998;19:2151-8.
224. Radziszewski P, Borkowski A, Torz C, Bossowska A, Gonkowski S, Majewski M. Distribution of collagen type VII in connective tissues of postmenopausal stress-incontinent women. *Gynecol Endocrinol* 2005;20(3):121-6.
225. Falconer C, Blomgren B, Johansson O, Ulmsten U, Malmström A, Westergren-Thorsson G, Ekman-Ordeberg G. Different organization of collagen fibrils in stress-incontinent women of fertile age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77(1):87-94.
226. Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Blomgren B, Johansson O, Ulmsten U, Westergren-Thorsson G, Malmström A. Paraurethral connective tissue in stress-incontinent women after menopause. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77(1):95-100.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the number of muscle fibers, blood vessels and collagen fibers in the urethra and uterus of castrated adult female rats, treated with soy isoflavone extract for 30 days, starting on the 5<sup>th</sup> or 28<sup>th</sup> day after castration.

**Methods:** 45 adult virgin female rats, *Rattus norvegicus albinus* (Rodentia Mammalia, Wistar EPM-1), weighing 200g on average, were fed a casein-based, soy-free diet. After five days of adaptation, they were anesthetized and underwent bilateral oophorectomy. Five days after castration, they were split into three groups of 15 rats each: Group I (control), castrated without treatment, receiving only the propylene glycol vehicle for 30 consecutive days, and sacrificed next; Group II (ISO5D), treated with isoflavones at the dose of 125 µg genistein/g body weight a day, from the 5<sup>th</sup> day of castration, for 30 consecutive days; Group III (ISO28D), treated with isoflavones at the dose of 125 µg genistein/g body weight a day, from the 28<sup>th</sup> day of castration, for 30 consecutive days. After thirty days of treatment, they were sacrificed. Isoflavone extract at 40%, containing 8.15% genistein and 19.19% daidzein, was administered by oral gavage. A preliminary study was conducted in order to standardize the extract dose, evaluating the effect on relative uterus weight of different genistein doses (2.5; 25; 50; 125 µg/g BW/day), using a negative control for comparison. After the sacrifice, a morphometric study of the uterus and mid urethra walls was conducted, counting the number of nuclei, blood vessels and collagen fibers.

**Results:** Regarding the uterus, the ISO5D and ISO28D groups differed from the control group in all respects. Regarding the urethra, only the ISO5D group differed from the control group, in terms of number of nuclei and collagen fibers. There was no difference between the ISO5D and ISO28D groups regarding the uterus. Regarding the urethra, there was a difference between the treatment groups in terms of number of nuclei and collagen fibers.

**Conclusion:** Our findings show that the oral administration of soy isoflavone extract to oophorectomized female adult rats, at the dose of 125 µg genistein/g BW/day, shows an uterotrophic effect. The early (5<sup>th</sup> day) administration of the extract after oophorectomy has an effect in the mid urethra, reversing the changes promoted by castration, which was not observed with the administration of the extract from the 28<sup>th</sup> day after oophorectomy.

**Bibliografia consultada**

BIREME. Centro Latino Americano e do Caribe de Informações em ciências da Saúde.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo; 2001. 86p.

Houaiss A, Villar MS, Franco FMM. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Rio de Janeiro. Editora Objetiva, 2001. 2925p.



# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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