

ESTIMATIVA DA TOXICIDADE MATERNA E FETAL EM RATAS WISTAR TRATADAS NO PERÍODO ORGANOGÊNICO COM UMA FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA COMERCIAL CONTENDO SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.]

BORTOLINI, C.E.¹, HOLLENBACH, C.B.¹, HOLLENBACH, E.B.¹, SCHUCH T. L.¹, PACHECO M. H.¹, MELLO, F. B.², MELLO, J.R.¹.

Resumo

A soja e seus constituintes foram consumidos por muitos séculos, sem quaisquer aparentes efeitos adversos e associadas a benefícios à saúde. No entanto, a preocupação levantada dos potenciais efeitos adversos da atividade estrogênica das isoflavonas, sugerem diversos estudos de segurança com o uso das preparações fitoterápicas contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr]. O presente estudo realizado com uma formulação fitoterápica comercial, no período embriogênico, buscou avaliar a toxicidade sistêmica materna e da prole de ratas Wistars tratadas no período de embriogênese. A medicação foi administrada por via oro-gástrica, do 6° ao 15° dia de gestação. As fêmeas foram monitoradas diariamente durante todo o período gestacional e os filhotes no momento do nascimento. Foi possível observar indícios de toxicidade materna no período de organogênese e no parto. Os grupos GS2 (13,29 ± 4,37%) e GS3 (15,42 ± 6,01%) obtiveram ganhos de massa corporal inferiores; GS1 (14,25 ± 3,59%) e GS3 (14,57 ± 3,54%) redução da ingestão hídrica e GS2 (2/12; 6/12) e GS3 (2/12; 9/12) presença de conteúdo uterino hemorrágico e petéquias na parede uterina. Na prole os grupos GS3 (4,85 ± 0,46g), GS1 (4,99 ± 0,47g) e GC+ (5,05 ± 0,57g) evidenciaram menor ganho de peso embrionário e GS1 (21/133), GC+ (22/114), GS2 (19/111) e GS3 (40/115) presença de hematomas cutâneos. Os resultados demonstraram que o grupo de menor dose não apresentou sinais de toxicidade materna e fetal, sugerindo que a preparação comercial fitoterápica contendo soja *Glycine max* (L.) Merr 40% pode interferir na gestação, quando administrada no período de organogênese.

Palavras-chaves: embriogênese, embriotoxicidade, fitoestrógenos, isoflavonas.

Introdução

A fitoterapia vem sendo considerada um método de cura ideal e estudos científicos comprovam sua eficácia, estando ela ao alcance de toda a população. Os fitoterápicos têm seus valores curativos reconhecidos, custam pouco e possuem menores efeitos adversos. No Brasil existe um grande número de plantas com potencial de cura, mas poucas espécies já foram cientificamente estudadas (CARVALHO et al., 2008).

As formulações farmacêuticas de isoflavonas segundo a ANVISA são consideradas como fitomedicamento pelas suas ações terapêuticas. As

¹Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, UFRGS – Porto Alegre – RS.

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS – Porto Alegre – RS.

isoflavonas ocorrem naturalmente nos grãos de soja e derivados como a farinha de soja e quando consumidas, são hidrolisadas em parte pelo suco gástrico liberando as agliconas, como a daidzeína, genisteína e gliciteína, que serão absorvidas diretamente no intestino ou biotransformadas por ação de bactérias glicosidases. Todos estes precursores e metabólitos vão exercer atividade estrogênica em animais e humanos (TAPIERO et al., 2002).

Nos órgãos-alvo tendem a formar ligações estáveis com os receptores hormonais, porém com uma ação estrogênica muito fraca, o que lhes confere uma ação reguladora em situações de hiper e hipoestrogenismo (ALVES et al., 2002).

Os estrogênios estão relacionados as características femininas, controle reprodutivo e gravidez. Influenciam a pele, ossos, sistema cardiovascular e a imunidade (CLAPAUCH et al., 2002). As isoflavonas são fracamente estrogênicas. Na presença dos estrogênios elas funcionam como antiestrógenos, competindo pelos sítios de ligação. Na ausência de estrogênio, essas substâncias apresentam efeito estrogênico e substitui o hormônio (QUEIROZ, 2004).

Apesar do avanço das pesquisas nestas últimas décadas, apenas 30 a 35% das causas das malformações humanas podem ter suas causas esclarecidas, em face da grande dificuldade de se recuperar a história do paciente e também do fato de a grande maioria dos casos de malformações estar relacionada a vários fatores intercorrentes (LEMONICA, 2008).

A alta concentração de derivados de soja em algumas fórmulas pediátricas, dietas alimentares e fitoterápicos suscita, preocupação relacionada aos possíveis efeitos a potencial ação hormonal dos fitoestrogênios em períodos críticos de desenvolvimento (CLAPAUCH et al., 2002).

Durante o período de gestação, a exposição materna a um agente tóxico pode levar a respostas diversas e seu efeito final variar desde a morte até o nascimento de um indivíduo normal (LEMONICA, 2008). Neste trabalho é apresentado o resultado inicial da avaliação do efeito tóxico da exposição pré-natal a uma preparação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr 40%.

Material e Métodos

O fitoterápico utilizado no experimento, foi adquirido em estabelecimentos farmacêuticos locais. A composição testada contém extrato seco de *Glycine max* (L.) Merr 40%, com concentração de 60mg de isoflavonas por cápsula.

Foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos, provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde com condição constante de umidade, temperatura (21°C +/- 2), ciclo de luz claro/escuro de 12 horas e alojada em caixas separada, com cama limpa e renovada periodicamente. Antes do início dos experimentos, os animais passaram por um período de uma semana de adaptação às condições do biotério setorial.

¹Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, UFRGS – Porto Alegre – RS.

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS – Porto Alegre – RS.

No período de acasalamento foi utilizada a relação de três fêmeas previamente avaliadas para a detecção da fase do ciclo estral para cada macho, permanecendo juntos durante todo o período escuro. A constatação da gestação ocorreu pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal logo após o término do período de acasalamento. Vinte quatro horas após a constatação de esfregaço vaginal positivo as fêmeas foram consideradas no primeiro dia de gestação.

Foram constituídos cinco grupos experimentais com 12 fêmeas gestantes em cada um. O grupo controle negativo (GC-), grupo tratado com a dose recomendada pelo fabricante (GS1), grupo controle positivo (GC+), grupo tratado com dose intermediária (GS2) e o grupo com a maior dose (GS3).

A formulação fitoterápica foi administrada por via oro-gástrica, com volume idêntico em todos os grupos, correspondendo a 10ml/kg, nas doses de 0 (GC-); 2,14 (GS1); 4,28 (GC+); 10,71 (GS2); 21,42 (GS3) mg /kg/dia de isoflavona, do 6° ao 15° dia de gestação das fêmeas. Foram monitorados nas progenitoras, os consumos de ração, a ingestão de água, o ganho de massa corporal diário e também parâmetros clínicos (salivação abundante, pelos arrepiados, diarreia, hemorragia e apatia) durante os 21 dias de gestação.

No 21° dia de gestação, as fêmeas gestantes sofreram cesarianas, sendo previamente anestesiadas (zolazepan + tiletamina) e após decapitadas. Logo em seguida era realizada a laparotomia onde eram expostos e inspecionados os cornos uterinos e realizadas as contagens dos sítios de implantação e dos pontos de reabsorção. Após foi realizada a remoção dos cornos uterinos, a pesagem do útero gravídico e a contagem do número de fetos. Com a remoção dos fetos de seus envoltórios fetais os mesmos foram observados quanto a sua viabilidade, presença de malformação e/ou anomalias macroscópicas externas, sexo e peso ao nascer.

A metodologia utilizada nas análises estatística inclui os testes: Análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey para as variáveis quantitativas e o Qui-quadrado para as variáveis qualitativas.

Resultados e Discussão

A avaliação nas fêmeas gestantes foi realizada durante as fases de implantação, embriogênese e desenvolvimento fetal. Quando comparadas estatisticamente, na fase de implantação não demonstraram diferença, no ganho de massa corporal, consumo de ração e ingestão de água e também não apresentaram alterações nos parâmetros clínicos avaliados, durante o estágio que compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto, fase que antecede o intervalo de tratamento, demonstrando que os grupos são homogêneos ($p > 0,05$).

No entanto, os grupos: GS2 ($13,29 \pm 4,37\%$) e GS3 ($15,42 \pm 6,01\%$) obtiveram ganhos de massa corporal inferiores aos demais grupos; GS1 ($14,25 \pm 3,59\%$) e GS3 ($14,57 \pm 3,54\%$) redução da ingestão hídrica em relação aos demais, porém não demonstrou diferença quando comparados estatisticamente

¹Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, UFRGS – Porto Alegre – RS.

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS – Porto Alegre – RS.

com os grupos GC+ ($15,30 \pm 3,75\%$) e GS2 ($15,02 \pm 4,69\%$). No entanto o grupo GC- ($16,54 \pm 5,64\%$) demonstrou maior ingestão hídrica, e quando comparados estatisticamente aos demais grupos apontaram diferença significativa no período de tratamento ($p < 0,05$), fase mais suscetível à ação de teratógenos e única período teratogênico da gestação (MOORE & PERSAUD, 2008). O consumo de ração não apresentou diferença estatística neste período ($p > 0,05$). No período de organogênese, a exposição materna a teratógenos pode levar ao aparecimento de malformações na prole (MELLO & LANGELOH, 2006). A escolha das doses adequadas é de grande importância, pois uma escolha inadequada pode vir a comprometer a validade dos dados obtidos. A menor dose de exposição objetiva dar uma idéia clara sobre a dose que não venha a causar efeitos tóxicos maternos e/ou fetais (LEMONICA, 2001).

Na fase de desenvolvimento fetal (após o período de tratamento), os grupos não demonstraram diferença, no ganho de massa corporal, consumo de ração e ingestão de água, quando comparados estatisticamente ($p > 0,05$).

Através do teste estatístico foi possível verificar que as alterações macroscópicas internas não ocorreram com a mesma proporção ($p < 0,05$) entre os grupos tratados. No exame macroscópico do útero, foi constatada a presença de conteúdo uterino hemorrágico e petéquias na parede uterina, nos grupos de maior dose, GC- (0/12; 0/12), GS1 (0/12; 0/12), GC+ (0/12; 0/12), GS2 (2/12; 6/12) e GS3 (2/12; 9/12). A genisteína metabólito da isoflavona tem mostrado supressão de formação de trombo por inibição da ativação plaquetária e agregação (TAPIERO, 2002). Dietas que incluem isoflavonas, testadas em ratos demonstraram diminuir a ativação plaquetária (SCHOENE, 1999). As plaquetas participam na formação da rolha hemostática, sendo ativadas por exposição ao colágeno. Depois que ocorre a ativação, elas se aderem ao subentotélio lesado, ali se acumulam e se ligam entre si formando um trombo que é posteriormente estabilizado (BERNE & LEVY, 2000).

Não ocorreu diferença estatística entre os grupos, no número de filhotes por ninhada e no número de implantes uterinos. Porém efeitos adversos nos filhotes foram observados. A dose GS3 ($4,85 \pm 0,46g$) não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao GS1 ($4,99 \pm 0,47g$) e GC+ ($5,05 \pm 0,57g$) evidenciando o menor ganho de peso embrionário nas doses mencionadas ($p > 0,05$), já que as mesmas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao GC- ($5,33 \pm 0,44g$). O grupo GS2 ($5,09 \pm 0,75g$) não demonstrou diferença estatística significativa quando comparado aos grupos GC-, GC+, GS1 ($p > 0,05$). Os resultados obtidos com a avaliação dos filhotes foram compatíveis aos achados de suas progenitoras, sugerindo que a exposição materna a agentes tóxicos durante o período de embriogênese pode prejudicar a formação dos indivíduos de sua prole (MELLO & LANGELOH, 2006).

No exame físico dos filhotes foi possível verificar hematomas cutâneos em áreas diversas, com maior incidência na região dorsal entre as escápulas. Esses achados ocorreram na mesma proporção ($p > 0,05$) entre fêmeas (55/308) e machos (51/292). No entanto, o estudo demonstrou que a proporção não foi a mesma ($p < 0,05$) entre os grupos GC- (0/127), GS1 (21/133), GC+ (22/114), GS2 (19/111) e GS3 (40/115). Juntamente com os achados macroscópicos internos

¹Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, UFRGS – Porto Alegre – RS.

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS – Porto Alegre – RS.

reprodutivos nas fêmeas gestantes, as alterações encontradas nos filhotes dos grupos tratados sugerem prejuízo no processo de agregação plaquetária relacionado como um dos processos de homeostase (BERNE & LEVY, 2000; TAPIERO, 2002).

Conclusões

Os resultados evidenciaram que somente o grupo que não recebeu o fitoestrógeno não sofreu prejuízos reprodutivos, demonstrando a melhor performance no ganho de peso embrionário e ausência de hematomas cutâneos na prole e também, não obteve déficit no ganho de massa corporal, consumo de ração e ingestão de água e manifestações de distúrbios no trato reprodutivo nas fêmeas, quando comparado com os demais grupos, sugerindo que a preparação comercial fitoterápica contendo soja *Glycine max* (L.) Merr 40% pode interferir na gestação de fêmeas tratadas no período organogênico. Desta forma são importantes a execução de novos estudos de segurança, com a finalidade de buscar mecanismos específicos para esses achados.

Referências Bibliográficas

ALVES, D.L. et al. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

ANVISA. www.anvisa.gov.br/faq/al_isoflavonas.htm. Disponível em 18/07/2008.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Sangue e Hemostasia. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Fisiologia. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, p. 303–308, 2000.

CARVALHO, G.D., SOUZA, E.D., Souza, L.A. et al. Perfil de famílias interioranas que fazem uso de plantas medicinais. PUBVET, V.2, N.12, Mar5, 2008.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrogênios: Posicionamento de Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. V.46, n.6, p.670 – 695, 2002.

QUEIROZ, S. C. N. A importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana. Disponível em 25/07/2008 www.cnpma.embrapa.br/informativo/mostrainformativo.phd3id=191.htm

¹Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, UFRGS – Porto Alegre – RS.

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS – Porto Alegre – RS.

LEMONICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SANSEVERINO, M. T. V. et al. Manual de teratogênese. Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 19 – 40, 2001.

LEMONICA, I. P. Toxicologia da Reprodução. In: OGA, S. Et al. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Editora Atheneu, 3^oed., p. 101 – 113, 2008.

MELLO, J. R. B.; LANGELOH, A. Avaliação da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade. In: RHODEN, E. L.; RHODEN, C.R. Princípios e técnicas em experimentação animal. Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 455– 464, 2006.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Introdução à embriologia. In: MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia básica. Rio de Janeiro: Elsevier, 7^oed., cap.1, p. 01 – 08, 2008.

SCHOENE, N. W.; GUIRDY, C. Dietary soy isoflavone inhibit activation of rat platelets. The Journal of nutritional Biochemistry. V.10, p. 421 – 426, 1999.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; TEW, K. D. Estrogen and environmental estrogens. Biomedicine & Pharmacotherapy. V.56, p.36-44, 2002.

¹Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, UFRGS – Porto Alegre – RS.

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS – Porto Alegre – RS.