

AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE RATOS WISTAR MACHOS TRATADOS COM PREPARAÇÃO FITOTERÁPICA COMERCIAL À BASE DE SOJA *Glycine max* (L.) Merr

Hollenbach, C.B.¹, Bortolini, C.E.¹ *, Batista, J.M.¹, Hollenbach, E.B.¹, Schuch T. L.¹, Pacheco M. H., Mello, F. B.², Mello, J.R.¹.

INTRODUÇÃO

As isoflavonas presentes na soja pertencem à família dos polifenóis, uma grande classe de substâncias sintetizadas pelas plantas. Além da atividade antioxidante, comum aos polifenóis, as isoflavonas por sua semelhança estrutural ao estrógeno humano, determinam efeitos estrogênicos importantes, sendo por isso referidos como fitoestrógenos (WANG & MURPHY, 1994).

Assim como existem muitos trabalhos revelando os efeitos benéficos relacionados ao consumo de vários derivados da soja, também é considerável a literatura sobre os potenciais efeitos adversos decorrentes da ingestão de soja e suas isoflavonas. São relatados: interferência no sistema imunológico, alterações na função tireoideana, redução da absorção de vitaminas e minerais, efeito sobre o processo de mielinização, desencadeamento de câncer, produção de danos no DNA, entre outros. (JU et al., 2001; ALLRED et al., 2001; MARKOVITS et al., 1989).

Os efeitos adversos mais amplamente documentados são os que indicam as ações sobre a reprodução. Nesse aspecto, a soja e suas isoflavonas são classificadas como compostos com atividade endócrina e por isso são referidas como desreguladores endócrinos (WISNIEWSKI et al., 2003).

Os fitoestrógenos funcionam como agonistas ou antagonistas estrogênicos. São hormônios agonistas/antagonistas naturais que ocupam destaque no grupo de desreguladores endócrinos. Até o momento, os estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” não mostraram resultados consistentes e uniformes sobre se os fitoestrógenos poderiam mimetizar as ações estrogênicas em todos os órgãos-alvo (CLAPAUCH, 2002).

A fertilidade dos homens é particularmente suscetível a agentes que reduzem o número e a qualidade da produção de espermatozoides. Testes de toxicidade reprodutiva são realizados para determinar os efeitos diretos de uma substância química sobre o processo de reprodução dos mamíferos. Os estudos mais utilizados para estas avaliações são divididos em três segmentos que são adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA) e recomendadas pela Food and Drugs Administration (FDA) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

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.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da preparação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (soja), Isoflavine® da Herbarium Laboratório Botânico Ltda., na dose de 43 mg/kg, equivalente a 10 vezes a dose terapêutica recomendada pelo fabricante, sobre a fertilidade de ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Os medicamentos fitoterápicos utilizados no experimento foram adquiridos em estabelecimentos farmacêuticos comerciais, contendo número de lote, data de fabricação e estando dentro do prazo de validade. Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas com 120 dias de idade provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) com condição constante de umidade e temperatura ($50\% \pm 5$; $21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro escuro de 12 horas (das 9h às 21h). Alimentados com ração comercial Nuvital CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Foram formados 3 grupos experimentais constituídos de 32 animais (8 machos e 24 fêmeas): 1 grupo teste que recebeu 43 mg/kg do fitoterápico Isoflavine® (GI) um grupo controle negativo tratado com o veículo (água destilada) (GC-) e grupo controle positivo (GC+) que recebeu isoflavonas da soja na dose 4mg/kg.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram tratados diariamente, por via oral, com sonda oro – gástrica flexível com volume idêntico em todos os grupos, correspondendo a 10ml/kg. Sendo os machos tratados durante 91 dias (antes do acasalamento e durante o acasalamento) e as fêmeas durante 77 dias (pré-acasalamento, gestação e lactação).

O período de acasalamento teve duração de 21 dias, na caixa de cada um dos machos foram introduzidas três fêmeas virgens, permanecendo com eles duas horas por dia (das 7h às 9h), correspondendo ao final do período escuro. Após esse período, os animais foram separados e a constatação de gestação foi realizada mediante a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal.

Os machos foram eutanasiados por decapitação, após anestesia com Tiletamina + Zolazepan, 48 horas após o último dia de acasalamento. Os órgãos sexuais foram removidos: testículos, epidídimo, ductos deferentes, vesícula seminal e próstata, também foram retirados os rins, fígado, baço e coração de cada um dos animais. Cada órgão foi dissecado e pesado em balança analítica. De um macerado de um testículo e epidídimo de cada animal foi realizada a contagem do número total de espermatozóides (cauda do epidídimo) e o número de espermátidas por animal (testículo). Do lavado de um ducto deferente de cada animal foi executado esfregaço em lâmina, para análise do percentual de alterações morfológicas de cabeça e cauda dos espermatozóides provenientes do ducto.

RESULTADOS

Tabela 1: Massa relativa dos órgãos (%) dos ratos tratados durante 91 dias com fitoterápico Isoflavine (GI) em três doses 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e erro padrão médio (epm).

Órgãos	GC- (n = 8)	GC+ (n = 5)	GI3 (n = 3)
Coração	1,07 ± 0,07	1,02 ± 0,05	0,91 ± 0,04
Baço	0,78 ± 0,05	0,76 ± 0,07	0,77 ± 0,12
Fígado	12,87±0,89	11,96±0,97	10,71±0,22
Rim D	1,16 ± 0,08	1,25 ± 0,06	1,13 ± 0,03
Rim E	1,14 ± 0,08	1,18 ± 0,06	1,12 ± 0,02
Testículo D	1,75 ± 0,06	1,79 ± 0,07	1,63 ± 0,13
Testículo E	1,75 ± 0,06	1,76 ± 0,05	1,64 ± 0,11
Epidídimo D	0,76 ± 0,05	0,62 ± 0,02	0,59 ± 0,03*
Epidídimo E	0,74 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,57 ± 0,05*
Próstata	0,81 ± 0,06	0,83 ± 0,09	0,66 ± 0,06
Vesícula seminal	0,67 ± 0,10	0,63 ± 0,10	0,65 ± 0,07

* Diferença estatística significativa (p < 0,05)

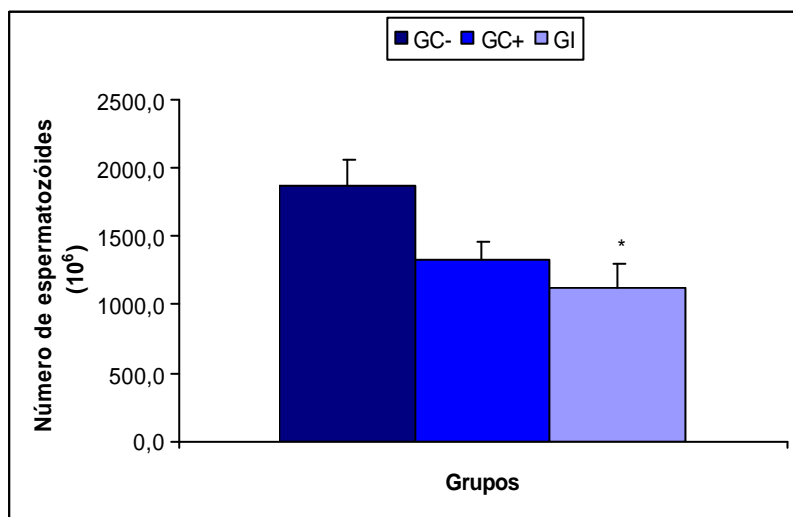


Gráfico 1: Número de espermatozoides presentes na cauda do epidídimo de ratos tratados durante 91 dias com Isoflavine® na dose 43 mg/kg (GI), um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm). * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo.

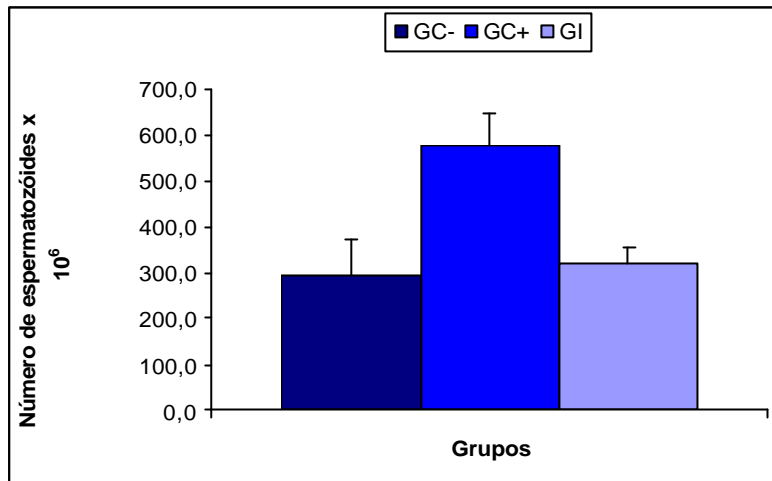


Gráfico 2: Produção diária de espermatozoides de ratos tratados durante 91 dias com o fitoterápico Isoflavine® na dose 43 mg/kg (GI), um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm. * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo.

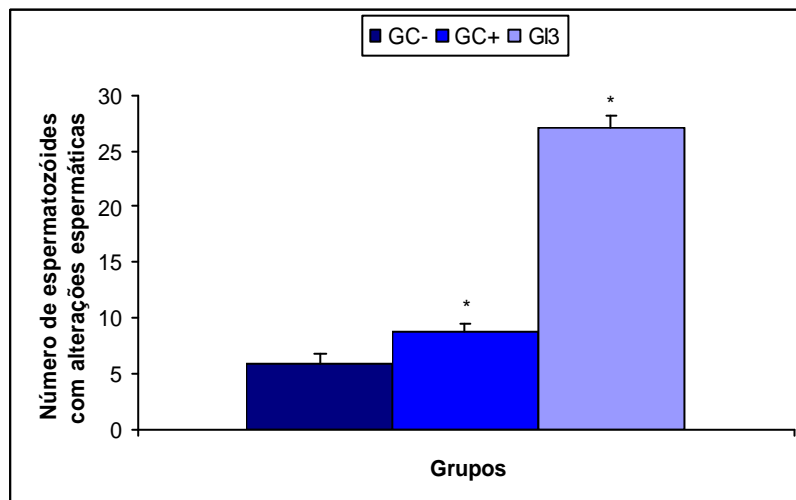


Gráfico 3: Número de espermatozoides com alterações morfológicas nos ratos tratados durante 91 dias com Isoflavine® na dose 43 mg/kg (GI), um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm. * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo.

Tabela 2: Índices reprodutivos de ratas tratadas com extrato do fitoterápico Isoflavine (GI). São apresentados os valores do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais.

Índices reprodutivos	GC-	GC+	GI3
Fêmeas acasaladas (n)	24	12	10
Machos acasalados (n)	8	5	5
Fêmeas com esfregaço vaginal positivo	18	5	3
Fêmeas prenhes (n)	13	1	0
Taxa de acasalamento (%)	69,2	45,5	37,5*
Taxa de gestação (%)	81,25	20*	0*
Taxa de perdas pós-implantação (%)	0	0	0

- Diferença estatística significativa ($p < 0,01$)

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, concluímos que a preparação fitoterápica testada na dose de 43 mg/kg interfere no peso dos epidídimos, na morfologia espermática na dose testada e no grupo controle positivo e no número total de espermatozóides de ratos Wistar, alterando as taxas reprodutivas das fêmeas, sugerindo toxicidade espermática para o fitoterápico, quando usado na dose que corresponde a 10 vezes a dose terapêutica, sob as condições testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLRED, C.D. et al. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. **Cancer Res**, v. 61, pp 5045-5050. Jul, 2001.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol.46, n.6, p 679-695, 2002.

EPA – Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Federal Register 61(212):56274-56322. October, 1996.

JU, Y.H. et al. Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. **Journal Nutr**, v.131, pp2957-2962. Nov, 2001.

MARKOVITS, J. et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. **Cancer Res**, v. 48, pp 5111-7. Sep, 1989.

OECD. The Validation of Test Methods Considered for Adoption as OECD Test Guidelines. **ENV/MC/CHEM** (98) 6. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998.

WANG, H; MURPHY, P.A. Isoflavones content in commercial soybean foods. **J. Agric food Chem**. V. 42:1666 – 1673, 1994.

WISNIEWSKI, A.B. et al. Exposure to genistein during gestation and lactacion demasculinizes the reproductive system in rats. **Journal of Urol**, v. 169, pp 1582 - 1586. April, 2003.