

# O DESENVOLVIMENTO PÓS - NATAL DA PROLE DE RATOS WISTAR NO ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE DUAS PREPARAÇÕES FITOTERÁPICAS CONTENDO SOJA *Glycine max* (L.) Merr

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

## INTRODUÇÃO

A soja pertence à família Fabaceae (leguminosa), é cultivada como alimento tanto para humanos quanto para animais em todo o mundo. O grão maduro pode ser torrado e consumido na forma íntegra ou triturado, o grão imaturo pode ser consumido na forma de brotos, os grãos processados dão origem ao leite de soja, queijo e soro. O grão é rico em substâncias chamadas isoflavonas, denominadas de fitoestrógenos por apresentarem semelhança estrutural com os hormônios estrogênicos.

Há diversos registros na literatura referente aos usos da soja e de suas isoflavonas para a prevenção e tratamento de enfermidades. Além da substituição do leite animal em crianças com manifestações alérgicas, as principais indicações terapêuticas são: tratamento de sintomas pré e pós-menopausa na prevenção da osteoporose, na prevenção e tratamento de câncer, na prevenção de doenças cardiovasculares e como auxiliar no tratamento dos diabetes. No entanto, muitos estudos são contraditórios e estudos adicionais são necessários para garantir a segurança no uso destas substâncias.

Os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva geralmente compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento e, continuamente até sua maturação sexual. (LEMÔNICA, 2001). 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).

Nas fases pré e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central que ainda estão se diferenciando, podem ser atingidos por substâncias presentes no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação. Além disso, indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retro alimentação do sistema endócrino (ZENICK & KLEGG, 1989).

O tratamento dos machos antes da concepção pode resultar em infertilidade, morte embrionária, anomalias não específicas, bem como redução

---

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

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS – Porto Alegre – RS.

do peso ao nascer, diminuição do tamanho da ninhada e retardo do desenvolvimento pós-natal (COLIE, 1993; DELCLOS et al., 2001).

As características do conceito e sua capacidade de desenvolvimento e maturação são expressões da capacidade de fertilização de células germinativas, concepção bem sucedida e o subsequente desenvolvimento intra-uterino. O desenvolvimento peri e pós-natal depende do potencial de desenvolvimento do indivíduo e de sua habilidade de enfrentar variadas circunstâncias ambientais (MELLO & LANGELOH, 2006).

## OBJETIVO

Este estudo avaliou o desenvolvimento pós – natal da prole de ratos Wistar tratados com preparações fitoterápicas contendo *Glycine max* (L.) Merr. (soja), Isoflavine® da Herbarium Laboratório Botânico Ltda. e Soyfemme® da Ache Laboratórios Farmacêuticos S/A.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os fitoterápicos utilizados no experimento foram adquiridos em estabelecimentos farmacêuticos locais, 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, temperatura (21°C +/- 2) e ciclo de luz claro escuro de 12 horas (das 9h às 21h). Sendo alimentados com ração comercial Nuvital CR 1 ( Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Foram formados oito grupos experimentais constituídos de 32 animais (8 machos e 24 fêmeas): seis grupos teste que receberam 4,3mg/kg, 21,5mg/kg e 43mg/kg dos fitoterápicos Isoflavine® (GI) e Soyfemme® (GS) (GI1, GI2, GI3 e GS1, GS2, GS3) 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.

Os animais foram tratados diariamente, por via oral, com sonda oro - gástrica, 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).

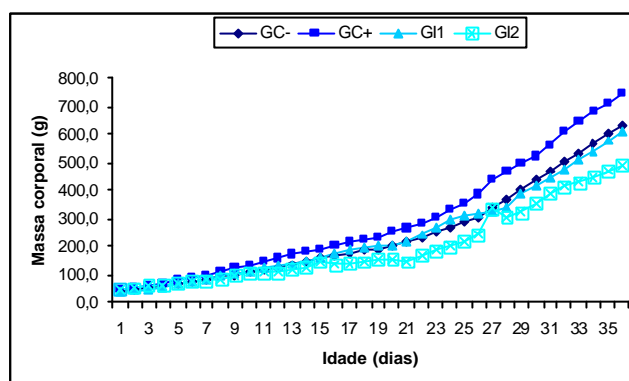
Metade das fêmeas prenhes sofreu cesariana no 21º dia de gestação, o restante das fêmeas pariu a termo e as suas proles foram avaliadas até a manifestação das características sexuais nos machos (descida dos testículos à bolsa escrotal e separação prepucial) e nas fêmeas (abertura do canal vaginal) e até a realização do teste de comportamento em campo aberto, aos 75 dias de idade.

O desenvolvimento pós-natal da prole das fêmeas paridas foi observado desde o dia do nascimento (dia zero). Os animais foram sexados e marcados individualmente. As ninhadas foram pesadas diariamente até o 35º dia pós-natal e os filhotes individualmente nos dias 0, 7, 14, e 21. Cada filhote foi avaliado quanto ao desenvolvimento físico geral, no qual foi observado o dia do

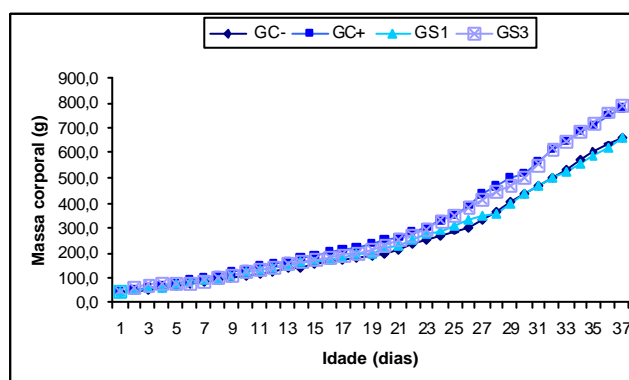
aparecimento da penugem, descolamento dos pavilhões auriculares, erupção dos dentes incisivos, desenvolvimento do pêlo, abertura dos olhos e desenvolvimento sexual, onde foi observado o dia da descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal.

A prole de cada grupo teve seu comportamento testado através do teste de campo aberto. O teste consistiu na mensuração das variáveis comportamentais dos filhotes aos 75 dias de idade. Foram analisadas as categorias comportamentais: atividade exploratória (caracterizada pela locomoção total e permanência no centro), “escanear” e “rearing” (permanecer sobre duas patas traseiras investigando o ambiente, no centro do campo aberto ou nas laterais, respectivamente), auto-limpeza (número de vezes que o animal utiliza as patas dianteiras para limpeza) (AZEVEDO, 2005).

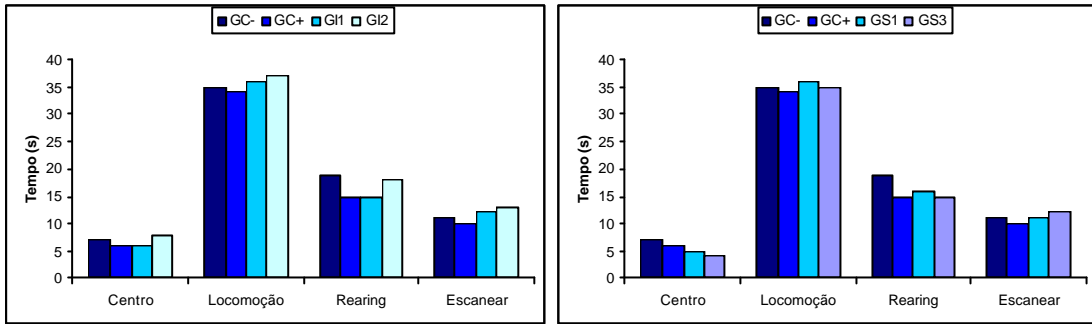
## RESULTADOS



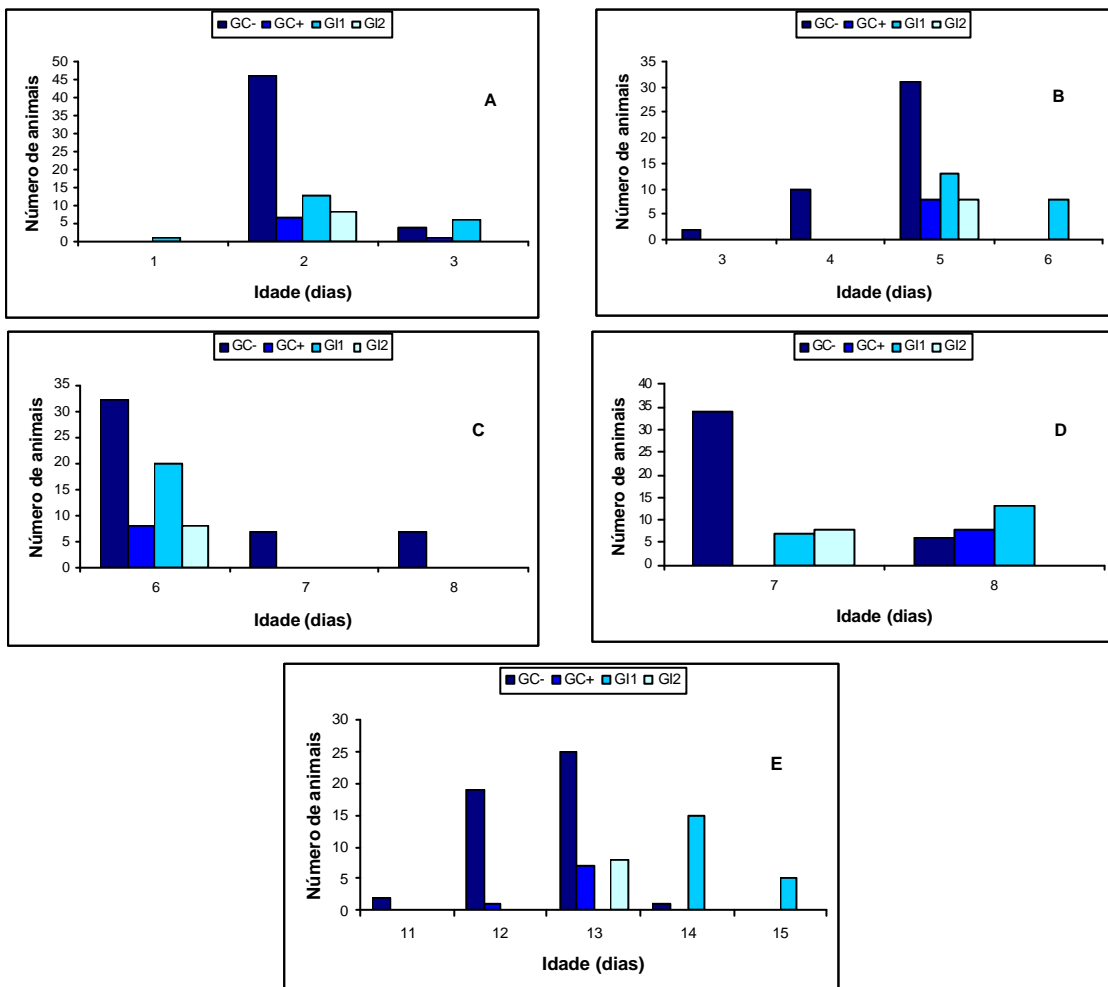
Desenvolvimento ponderal (g) das progênes desde o nascimento até o 36º dia, nascidas de ratas tratadas com Isoflavine (GS) em duas doses: 4,3 e 21,5mg/kg e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.



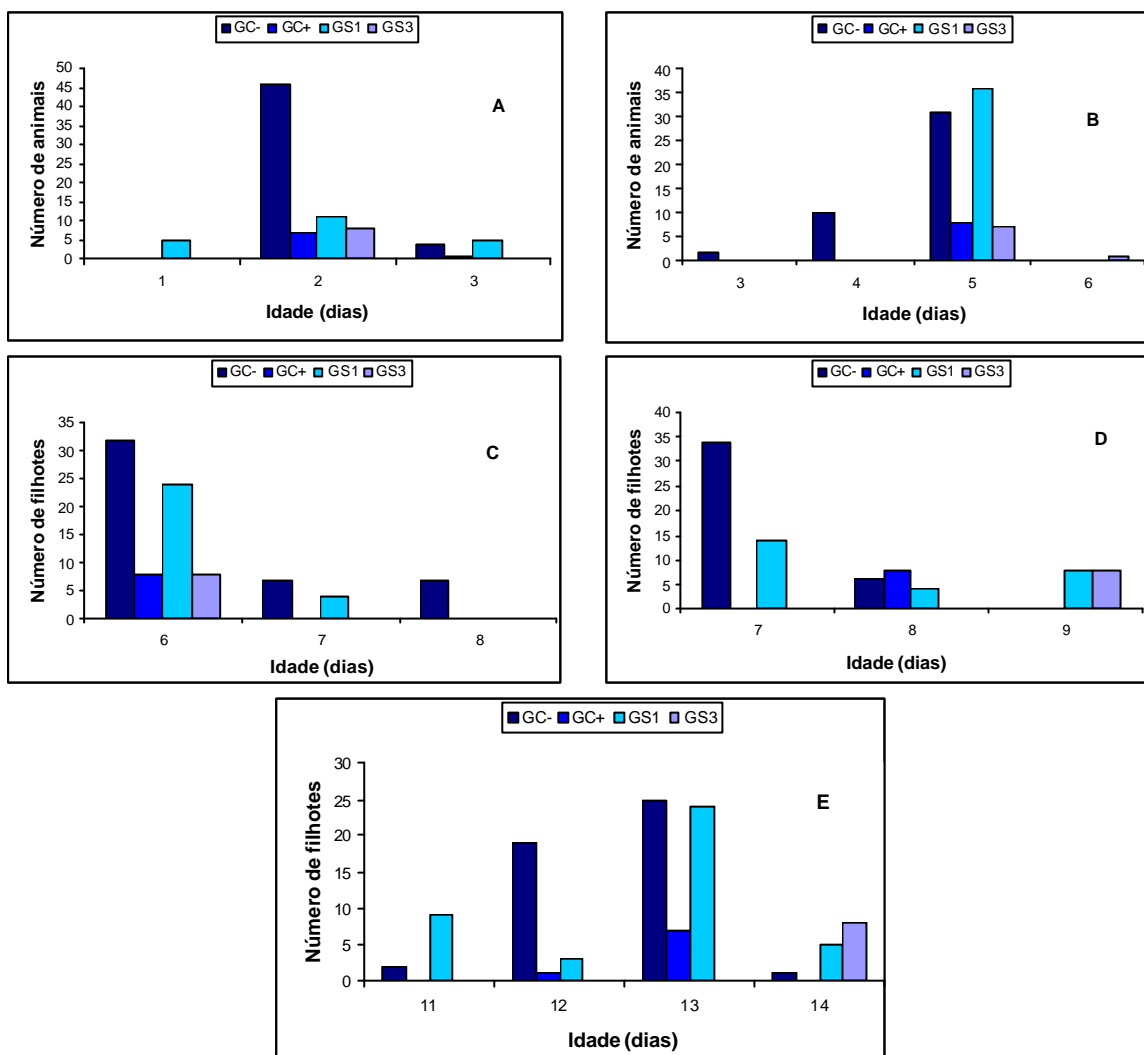
Desenvolvimento ponderal (g) das progênes desde o nascimento até o 36º dia, nascidas de ratas tratadas com o Soyfemine (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg/kg e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.



Freqüência de entrada no centro do campo aberto, tempo de locomoção total dentro da caixa, comportamento de “rearing” e comportamento de “escanear”. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. (GC- n = 2; GC+ n = 2; GI1 n = 2; GI2 n = 2; GS1 n = 2; GS3 n = 2).



Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento geral das progênes de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 43mg/kg e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.



Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento geral das progênes de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg/kg e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

## CONCLUSÃO

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis avaliadas nas progênes de ratos Wistar tratados com as preparações fitoterápicas contendo *Glycine max* (L.) Merr. (soja), Isoflavine® da Herbarium Laboratório Botânico Ltda. e Soyfemme® da Ache Laboratórios Farmacêuticos S/A. Com base nestes resultados podemos concluir que o tratamento dos pais não interferiu no teste de comportamento, no desenvolvimento ponderal, e nas características gerais e sexuais das proles.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, M.S. **Efeito de intervenções no ambiente neonatal sobre a relação mãe-filhote e o comportamento na idade adulta**. 2005, 100 folhas. Dissertação de mestrado em ciências biológicas: fisiologia. Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COLIE, C.F. Male mediated teratogenesis. **Reprod. Toxicol.** V.7:3-9. 1993.

DELCLOS, B. K. et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague Dawley) rats. **Reprod. Toxicol.**, v. 15, pp 647-663, 2001.

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

LEMÔNICA, I.P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M.T.V.; SCHÜLER-FACCINI, **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/ UFRGS, p. 19 – 39, 2001.

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 da UFRGS, pp 455 – 464, 2006.

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.

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