

AValiação DA FERTILIDADE DE RATAS WISTAR TRATADAS 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

A soja é um vegetal rico em isoflavonas, que contém um grupo de compostos não-esteróides, que podem se comportar como o estrogênio humano e por isso são chamados de fitoestrógenos. Atualmente os fitoestrógenos da soja recebem muita atenção devido ao seu potencial papel na prevenção e tratamento de câncer e outras doenças crônicas. Diferentes publicações têm discutido os benefícios dos fitoestrógenos, mas ainda assim acredita-se que as informações não são suficientes para fazer recomendações a esse respeito.

Segundo Cassidy et al. (1995) o consumo diário de 45 mg de Isoflavonas altera as características do ciclo menstrual em mulheres pré-menopáusicas saudáveis, prolongando a sua longitude, especificamente na fase folicular e diminuem a magnitude do pico do ciclo FSH e LH.

Com relação aos usos peri-menopausa os estudos são conflitantes. Brzezinski et al. (1997) concluíram através de um estudo com 145 mulheres pós-menopausa, recebendo dieta rica em fitoestrógenos durante 12 semanas, que houve redução dos sintomas de menopausa em 50%, dos fogachos em 54% e da secura vaginal em 60%. Albertazzi et al. (1999) e Upmalis et al. (2000), realizando estudos multicêntricos, duplo-cegos, randomizados e conta-placebo, concluíram que os fitoestrógenos aliviaram sintomas vasomotores, diminuíram a incidência e severidade das ondas de calor. Secreto et al. (2004), realizando estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado concluíram, por sua vez, que os resultados não mostraram qualquer vantagem de isoflavonas e melatonina sobre o placebo no alívio dos sintomas da menopausa.

Testes de toxicidade reprodutiva são realizados para determinar os efeitos diretos de uma substância química sobre o processo de reprodução dos mamíferos. 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).

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., em três doses: 4,3; 21,5 e 43 mg/kg, equivalente a dose terapêutica, 5 e 10 vezes a dose terapêutica recomendada pelo fabricante, respectivamente, sobre a fertilidade de ratas Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

O medicamento fitoterápico utilizado no experimento foi adquirido em estabelecimento farmacêutico comercial, 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 5 grupos experimentais constituídos de 32 animais (8 machos e 24 fêmeas): 3 grupos testes que receberam 4,3 mg/kg (GI1); 21,5 mg/kg (GI2) e 43 mg/kg (GI3) do fitoterápico Isoflavine®, um grupo controle negativo tratado com o veículo (água destilada) (GC-) e um 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 as fêmeas tratadas 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.

No 21º dia de gestação, metade das fêmeas gestantes de cada grupo após serem anestesiadas com Tiletamina + Zolazepan, foram eutanasiadas por decapitação. O útero gravídico foi retirado e pesado, com seu conteúdo. Após a retirada dos fetos, o útero foi inspecionado e foram contados os implantes uterinos.

A outra metade das fêmeas de cada grupo foi acompanhada deste parto até o 21º dia de lactação. Neste dia, as fêmeas foram anestesiadas com Tiletamina + Zolazepan e posteriormente eutanasiadas por decapitação. Foram removidos e inspecionados o fígado, baço, rins, ovários, útero e coração. Cada órgão foi pesado individualmente em balança analítica. No útero foram contados os implantes uterinos presentes. Os órgãos removidos foram enviados para análise histopatológica.

Foram calculadas taxas reprodutivas referentes à fertilidade das fêmeas, tanto das que tiveram cesariana no final da gestação quanto às fêmeas que pariram à termo.

RESULTADOS

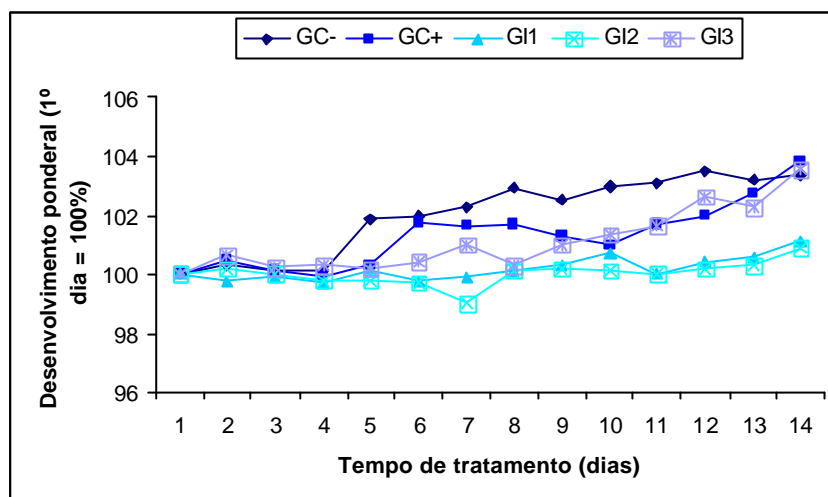


Gráfico 1. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de pré-acasalamento com Isoflavine® em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg/kg (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GI1 = 24; GI2 = 15; GI3 = 8).

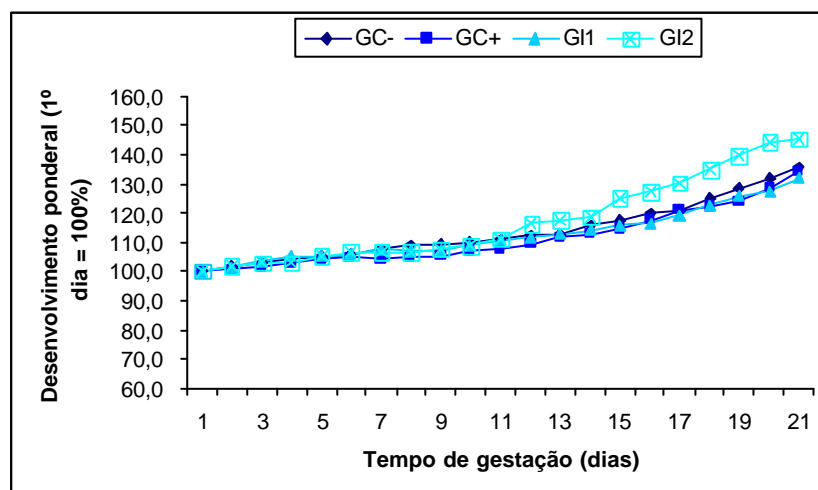


Gráfico 2. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de gestação com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg/kg um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GI1 = 13; GI2 = 2).

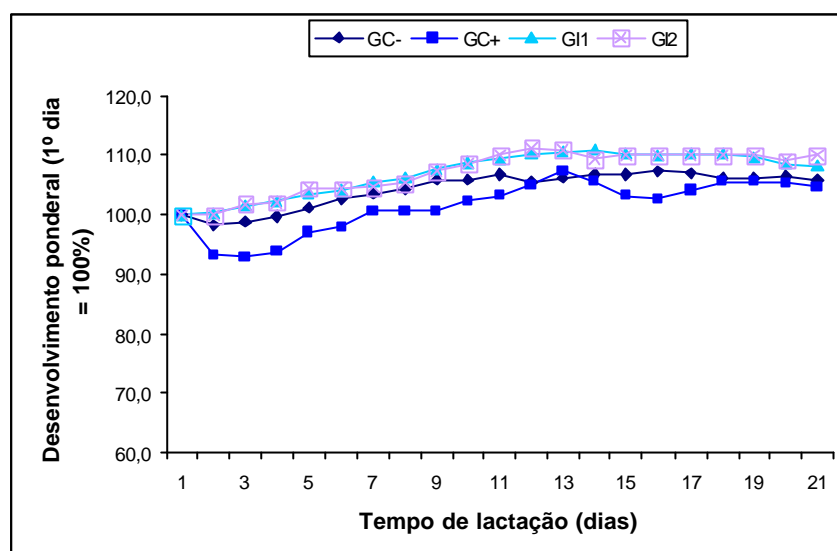


Gráfico 3. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante os 21 dias de lactação com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg/kg um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 5; GC+ = 1; GI1 = 2; GI2 = 1).

Tabela 1: 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+	GI1	GI2	GI3
Fêmeas acasaladas (n)	24	12	24	9	10
Machos acasalados (n)	8	5	8	5	5
Fêmeas com esfregaço vaginal positivo	18	5	6	2	3
Fêmeas prenhes (n)	13	1	6	2	0
Taxa de acasalamento (%)	69,2	45,5	22,2*	22*	37,5*
Taxa de gestação (%)	81,25	20*	100	100	0*
Taxa de perdas pós-implantação (%)	0	0	11,1*	8*	0

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

Tabela 2: Índices reprodutivos de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em três doses: 4,3; 21,5 e 43 mg/kg um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) e que pariram à termo. São apresentados os valores médios \pm epm do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais.

Índices Reprodutivos	GC-	GC+	GI1	GI2
N (progenitoras) Filhotes	(7) 47	(1) 8	(4) 13	(1) 9
Número de filhotes/ninhada	10,2 \pm 1,6	8	5,3 \pm 1,5	9
Massa corporal dos filhotes(g)	5,6 \pm 0,14	5 \pm 0,01	5,3 \pm 0,1	6 \pm 0,3
Taxa de parto (%)	100%	100%	100%	50%*
Taxa de natalidade (%)	100%	100%	100%	55,5%*
Taxa de viabilidade (%)	100%	100%	95,5%	100%
Taxa de desmame (%)	98,4%	100%	90,9%	100%

* Diferença estatística significativa (p < 0,01)

Tabela 3: Índices reprodutivos de ratas tratadas com Isoflavine® (GI) na dose 4,3 mg/kg comparada a um grupo controle negativo (GC-) e que sofreram cesariana no 21º dia de gestação. São apresentados os valores médios \pm epm do número de observações indicados (n).

Índices reprodutivos	GC-	GI1
N (progenitoras) Filhotes	(5) 61	(2) 17*
Massa do útero grávido (g)	68,35 \pm 8,0	64,21 \pm 3,6
Número de fetos/ninhada	10,2 \pm 1,6	10,2 \pm 0,8
Massa corporal dos fetos (g)	4,8 \pm 0,1	5,17 \pm 0,6
Alterações macroscópicas externas nos fetos	-	-

* Diferença estatística significativa (p < 0,05)

CONCLUSÕES

Nas fêmeas, a administração da preparação fitoterápica Isoflavine® contendo soja *Glycine max* (L.) Merr durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação, nas doses 21,5mg/kg e 43mg/kg ocasiona alteração no desenvolvimento ponderal no período pré-acasalamento, ocasiona aumento no número de reabsorções e modificação da taxas reprodutivas calculadas. Nas doses testadas não altera os pesos dos órgãos sexuais nem nos demais órgãos analisados e não apresenta lesões histológicas nestes órgãos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTAZZI, P. et al. The effect of dietary soy supplementation on hot flashes. **Obstet Gynecol**, v. 91, pp 6-11. Jan, 1998.

BREZEZINSKI, A., SCHENKER, J.C. Induction of ovulation and risk of breast cancer: an overview and perspectives. **Gynecol Endocrinol**, v. 11, pp 357-364. Oct, 1997.

CASSIDY, A., BINGHAM, S., SETCHELL, K. Abstract. **Br J Nutr**. V.74, p. 587-601, 1995.

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

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.

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.

SECRETO, G. et al. Soy isoflavones and melatonin for the relief of climacteric symptoms: a multicenter, double-blind, randomized study. **Maturitas**, v. 47, pp 11-20, 2004.

UPMALIS, D.H. et al. Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tables in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Menopause**, v. 7, pp 236-242, Jul-aug, 2000.

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.