

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS ISOFLAVONAS DE SOJA EM RATAS COM HIPOESTROGENISMO INDUZIDO*

EVALUATION OF THE EFFECTS OF SOY ISOFLAVONES IN RATAS WITH INDUCED HYPOESTROGENISM

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LAS ISOFLAVONAS DE SOJA EN RATAS CON HIPOESTROGENISMO INDUCIDA

Geyse Albuquerque Ribeiro

Rafael Moreira Aquino

Ramon Carreiro Neiva Silva

Raimundo Nonato Carneiro da Silva Junior

Ahirlan Silva de Castro

Selma do Nascimento Silva

Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

Antonio Carlos Romão Borges

Raimunda Ribeiro da Silva

Marilene Oliveira da Rocha Borges

Resumo: O climatério é o período da vida feminina no qual o organismo sofre mudanças no metabolismo decorrentes da queda estrogênica, resultando em efeitos sobre os principais sistemas, influenciando na qualidade de vida e comportamento da mulher. Para tratamento, se utiliza a reposição hormonal de estrógeno. Contudo, essa opção tem trazido muitos efeitos colaterais, inclusive o desenvolvimento de neoplasias. Como alternativa a aliviar tais efeitos, têm sido utilizados fitoestrógenos, pois exercem ação agonista do hormônio em seus receptores sem causar os efeitos colaterais indesejados. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos das isoflavonas de soja sobre o útero, consumo alimentar, peso corporal e ciclo estral de ratas ooforectomizadas. Foram utilizadas ratas wistar submetidas à ooforectomia e por 90 dias foram tratadas diariamente de acordo com o grupo de estudo: ooforectomizadas tratadas com placebo, ooforectomizadas tratadas com isoflavonas de soja, ooforectomizadas tratadas com benzoato de estradiol e grupo falso-operado. As ratas tratadas com isoflavonas de soja tiveram o ciclo estral regular semelhante ao grupo falso-operado. Porém, apresentaram perda ponderal similar ao grupo do tratamento hormonal.

Palavras-chave: Isoflavonas. Útero. Ratas. Hormonal.

Abstract: The climacteric is the period of life in which the female body goes through changes in metabolism following a strogenic fall resulting in effects on the major systems influencing the quality of life and behavior of women. For treatment is used estrogen replacement therapy. Yet it has brought many side effects, including cancer development. As an alternative to alleviate such effects, phytoestrogens have been used because exert hormone agonist to its receptors without causing unwanted side effects. This study aims to evaluate the effects of soy isoflavones on the uterus, food intake, body weight and estrous cycle in ovariectomized rats. We used Wistar rats underwent oophorectomy and were treated for 90 days daily according to the study group: ovariectomized and treated with placebo, ovariectomized treated with soy isoflavones, ovariectomized and treated with estradiol benzoate and false-operated group. The rats treated with soy isoflavones had regular estrous cycle similar to the false-operated group. However, showed similar weight loss to the group of hormone treatment.

Keywords: Isoflavones. Uterus. Rats. Hormone.

Resumen: El climaterio es el período de la vida en la que el cuerpo de la mujer pasa por cambios en el metabolismo como consecuencia de una caída estrogénica y afectando los sistemas principales que influyen en la calidad de vida y comportamiento de la mujer. Como tratamiento se emplea la terapia de reemplazo de estrógeno. Sin embargo, esto ha traído muchos efectos secundarios, incluyendo el desarrollo de cáncer. Como una alternativa para aliviar esas consecuencias han sido utilizados fitoestrógenos, los cuales ejercen una acción agonistas del hormonio en sus receptores, sin causar efectos secundarios no deseados. Este estudio tiene como objetivo evaluar los efectos de las isoflavonas de la soja en el útero, en la ingestión de alimentos, en el peso corporal y en el ciclo estral en ratas ovariectomizadas. Se utilizaron ratas Wistar que se sometieron a ovariectomización y fueron tratadas diariamente durante 90 días de acuerdo con el grupo de estudio: ovariectomizadas y tratadas con el placebo, ovariectomizadas tratadas con isoflavonas de soja, ovariectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol y el grupo de falso-operado. Las ratas tratadas con isoflavonas de soja con presentaron un ciclo estral regular de manera semejante al grupo de falso-operado. Sin embargo, mostraron una pérdida de peso similar al grupo de tratamiento hormonal.

Palabras clave: Isoflavonas. Útero. Ratas. Hormonal.

* Trabalho premiado durante o XXII Encontro do SEMIC realizado na UFMA entre os dias 25 a 27 de outubro de 2010.

Artigo recebido em fevereiro 2011

Aprovado em março 2011

1 INTRODUÇÃO

O climatério é uma fase de transição da vida feminina compreendido entre o final da menacme até a senilidade, ou seja, a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo da mulher (MIRANDA et al., 2010). As principais sintomatologias desta fase são: fogachos, sudorese noturna, cefaléias, alterações no metabolismo ósseo, cardiovascular, depressão, irritabilidade, perda da libido, fadiga (PARDINI, 2007).

A idade estimada para início da menopausa é de 51,2 anos (PEDRO, 2003). A população brasileira é composta por cerca de 189,6 milhões de pessoas (IBGE, 2008), sendo mais da metade dela constituída pelo sexo feminino do qual um terço de vida corresponde ao climatério (POLISSENI et al., 2009).

Há aspectos negativos relacionados à hormonioterapia no tratamento dos sintomas indesejáveis do climatério como aumento dos riscos relativos de algumas neoplasias hormônio-dependentes, tais como endométrio e mama, aumento de peso corpóreo, alteração do perfil lipídico (MOSQUETE et al., 2006). Uma das alternativas para evitar a ação negativa da terapia de reposição hormonal é o uso dos fitoestrógenos. Destes, o mais eficaz são as isoflavonas de soja (HAN et al., 2002).

A resposta ocorre devido aos sítios de ligação dos receptores. No endométrio e nas glândulas mamárias, existe o receptor alfa (SHEARMAN et al., 2003; KUIPER et al., 1997). O receptor beta, presente no tecido ósseo e no sistema nervoso central, também possui ligação com os receptores estrogênicos (TAYLOR et al., 2009). A semelhança química das isoflavonas com os estrogênios é responsável pela sua habilidade em se ligar aos receptores estrogênicos (MURKIES; WILCOX; DAVIS, 1998).

O uso do modelo animal como as ratas da espécie *Rattus norvegicus* permite a avaliação do efeito direto dos hormônios sobre o endométrio. Muitos estudos pré-clínicos utilizam esta espécie animal na avaliação dos efeitos de fitoestrógenos em modelos de hipoestrogenismo (MOSQUETTE et al., 2006).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Albinus, provenientes do Biotério da UFMA. Para o desenvolvimento do projeto, foram utilizadas ratas

adultas com 75 dias de idade e com pesos variando entre 150 e 200 gramas, com acesso *ad libitum* à comida (ração) e água e mantidas sob ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura de 20 a 25o C.

2.1 Grupos experimentais

- a) Grupo Falso-operado (FO) - constituído por ratas submetidas a uma falsa cirurgia, ou seja, foi realizada uma incisão transversal bilateral acima da fossa ilíaca de aproximadamente 2 cm e, posteriormente, foi realizada a sutura, sem a ocorrência da retirada dos ovários;
- b) Grupo ooforectomizado e tratado com Benzoato de estradiol (BE): após 21 dias da ooforectomia, as ratas foram administradas com benzoato de estradiol na dose 10 µg/Kg, por via subcutânea, por um período de três meses;
- c) Grupo Ooforectomizado e tratado com o fitoestrógeno(ISO): após 21 dias da ooforectomia, as ratas foram administradas via oral, por um período de três meses, na dose 100 mg/Kg de peso do animal;
- d) Grupo ooforectomizado e tratado com salina (OOF): após 21 dias da ooforectomia, as ratas foram administradas por via oral, por um período de três meses, com solução salina 0,9% (1ml/Kg de peso do animal).

2.2 Sequência experimental

Este estudo foi do tipo experimental randomizado, realizado por um período de 4 meses.

2.2.1 Determinação do ciclo estral

A determinação do ciclo estral foi realizada através da análise do esfregaço vaginal coletado diariamente. A coleta do material vaginal foi realizada sempre entre 8 e 10 horas da manhã (DIEL; VOLLMER; SCHMIDT, 2002). A coleta da secreção vaginal foi realizada com o auxílio de uma micropipeta contendo 20µL de solução fisiológica e introduzida na vagina dos animais em uma profundidade de aproximadamente 0,5 cm de intróito vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

O material colhido foi colocado em lâmina de vidro na forma de camada fina e visualizado em microscópio óptico, onde foram observadas as características celulares para a identifi-

cação das fases do ciclo estral (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

2.2.2 Determinação do peso corporal dos animais

Durante todo o período de tratamento, foi realizado o controle de peso corporal das ratas determinado por meio da pesagem dos animais numa frequência de três vezes por semana. Este parâmetro foi utilizado para acompanhar o desenvolvimento ponderal das ratas e também para determinar o volume das drogas administradas diariamente.

2.2.3 Determinação do consumo de alimento (ração) dos animais

Durante todo o período do experimento, foi realizado o controle do consumo de ração das ratas. A ingesta de ração dos animais foi determinada em dias alternados na semana, sendo ofertada 300g de ração. As sobras de ração foram pesadas e subtraídas pela quantidade total ofertada e divididas pela quantidade de ratas em cada gaiola e pelo número de dias em que foi consumida. Com base neste cálculo, foi determinado o consumo de ração diária por rata em cada gaiola.

2.2.4 Ooforectomia

Durante a realização deste procedimento, as ratas foram anestesiadas com a associação dos anestésicos cloridrato de quetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (14mg/kg). Foram realizadas a tricotomia e a assepsia de região ventral dos animais (fossa ilíaca) e, posteriormente, a incisão transversal bilateral nas regiões da fossa ilíaca. Os ovários e as trompas foram identificados. As trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após ligadura. Posteriormente à incisão, foi realizada a sutura da parede muscular e, em seguida, da pele (VASCONCELLOS *et al.*, 2004).

2.2.5 Tratamento hormonal dos animais ooforectomizados

Após 21 dias da ooforectomia e comprovação do anestro, pela análise do esfregaço vaginal, foi iniciado o tratamento dos animais por via oral, diariamente, com fitoestrógeno diluído em salina e, por via subcutânea, benzoato de estradiol, diluído em óleo de milho

filtrado. O tratamento teve duração de 14 semanas, conforme descrito na distribuição dos grupos experimentais.

2.2.6 Determinação do peso uterino

Após a eutanásia das ratas, por exsanguinação, o intestino foi rebatido para melhor exposição do útero. Posteriormente, foi retirada toda a gordura aderida na extensão dos dois lobos. Em seguida, foi realizada a determinação do peso úmido do útero, em balança analítica de precisão.

2.2.7 Coleta do sangue e análise bioquímica

Após o período de tratamento, as ratas de todos os grupos experimentais foram anestesiadas com Quetamina (100mg/kg) e Xilazina (14mg/kg) intraperitoneal. Posteriormente, foi feita uma incisão abdominal para identificação e punção da artéria aorta abdominal, de onde foi coletado sangue, com auxílio de scalpe (nº 21), em tubos de ensaio. Após este procedimento, foi realizada, imediatamente, a extração do soro por centrifugação (3000 rpm/10 min), favorecendo a coagulação do sangue por incubação em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos. As dosagens quantitativas foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro para a determinação dos seguintes parâmetros bioquímicos: Creatinina, Glicose, Transaminase Oxalacética, Transaminase Pirúvica, Ácido Úrico e Uréia; utilizando-se a técnica, comprimento de onda e referências de acordo com o elemento dosado e orientação do fabricante dos reagentes (LABTEST®).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do ciclo estral

A análise da frequência do ciclo estral foi baseada na caracterização de cada fase de acordo com a proporção entre três tipos celulares: células epiteliais nucleadas, células cornificadas e leucócitos. Durante as duas semanas de controle do ciclo estral, todas as ratas apresentaram o ciclo regular, ou seja, apresentando quatro fases do ciclo estral.

Nos animais que foram ooforectomizados, a análise do esfregaço vaginal, durante o período de pós-ooforectomia (3 semanas), mostrou que esses animais se apresentavam em anestro. Já a análise do esfregaço vaginal do grupo falso-operado mostrou que esses animais apresen-

tavam-se com o ciclo estral regular, com as quatro fases distintas (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequências das fases do ciclo estral das ratas dos grupos falso-operado (FO), ooforetomizado (OOF), ooforetomizado e tratado com isoflavonas de soja (ISO) e ooforetomizado e tratado com benzoato de estradiol (BE), durante 14 semanas de tratamento.

GRUPOS DE TRATAMENTO	FREQUÊNCIAS DO CICLO ESTRAL(%)			
	PROESTRO	ESTRO	METAESTRO	DIESTRO
FO	29,3	25,7	29,8	15,2
OOF	2,4	0,04	17,8	79,8
ISO	21,6	24,7	24,9	28,8
BE	3,5	91,1	2,3	3,1

Verificou-se que o grupo tratado com isoflavona de soja (ISO) na dose de 100mg/Kg/dia por um período de 14 semanas apresentou a frequência do ciclo estral semelhante à do grupo falso-operado (FO), com as quatro fases do ciclo (tabela 1), sugerindo desta forma, uma simulação hormonal fisiológica, que apresenta alternância entre a fase estrogênica e a progesterônica, de forma semelhante à das ratas as quais permaneceram com seus ovários intactos. Estes dados estão de acordo com a literatura. Durante o ciclo estral de ratas, bem como em outros animais, são observadas fases de atuação do estrógeno (proestro e estro) e da progesterona (metaestro e diestro) (CONCEIÇÃO et al., 2005).

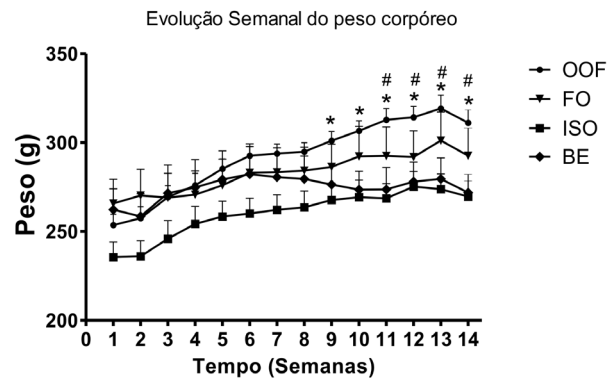
Tabela 2 - Avaliação Bioquímica de compostos séricos de ratas dos grupos falso-operado (FO), ooforetomizado (OOF), ooforetomizado e tratado com isoflavonas de soja (ISO) e ooforetomizado e tratado com benzoato de estradiol (BE), durante 14 semanas de tratamento.

Analito Bioquímico	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	OOF	ISO	FO	BE
Glicose	120,4 ± 8,329	144,2 ± 14,81	106,9 ± 0,5807	132,8 ± 15,43
Creatinina	0,46 ± 0,0163	0,5 ± 0,03162	0,48 ± 0,04014	0,47 ± 0,04787
Ureia	62,2 ± 3,119	61,2 ± 2,634	56,1 ± 2,722	62,7 ± 5,949
Ácido Úrico	2,2 ± 0,1681	1,9 ± 0,02449	2,3 ± 0,02921	1,9 ± 0,09574
TGO	121,5 ± 6,640	132,4 ± 12,1	107,7 ± 14,68	101,8 ± 20,69
TGP	69,9 ± 3,060	52,2 ± 6,111	47,5 ± 3,973	53,2 ± 3,092

3.2 Determinação do peso corpóreo

Durante o período de tratamento de 14 semanas, houve diferença significativa entre os grupos na análise ponderal, conforme mostrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Evolução ponderal (g) de ratas dos grupos falso-operado (FO), ooforetomizado (OOF), isoflavonas (ISO) e benzoato de estradiol (BE), durante 14 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média ± erro padrão. * significa diferença do grupo OOF em relação ao ISO e #significa diferença do grupo OOF em relação ao BE. ANOVA, Newman Keuls, (p<0,05), n= 6 a 12



Na análise do ganho ponderal, foi observada variação significativa entre os grupos que receberam benzoato de estradiol (BE) e isoflavonas de soja (ISO) em relação ao grupo ooforetomizado (OOF), de acordo com a variância ANOVA – Newman-Keuls (p<0,05).

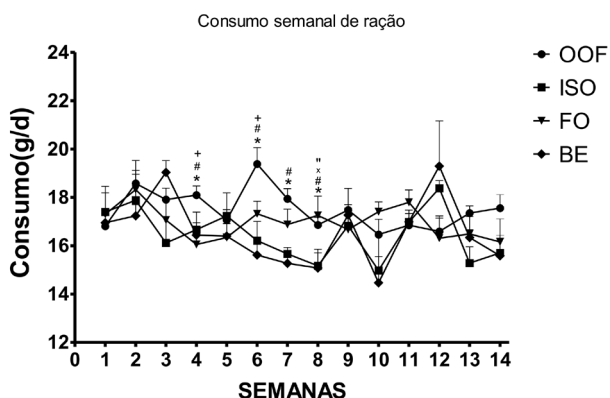
Segundo Torrezan et al. (2008), as isoflavonas aumentam a lipólise em adipócitos isolados de ratos e diminuem a lipogênese no tecido adiposo branco de ratas ooforetomizadas. De acordo com Pantaleão et al. (2009), a ooforectomia promove um aumento importante na massa corporal, revertida pelo tratamento com o Benzoato de Estradiol na dose de 0,7 µg/Kg/dia durante 21 dias de tratamento. Assim sendo, o tratamento crônico com o Benzoato de estradiol na dose de 10µg/Kg/dia por 14 semanas reverteu o aumento da massa corporal das ratas, induzido pela ooforectomia. No grupo tratado com isoflavonas de soja, também houve redução significativa de peso corporal das ratas, iniciado em período anterior ao observado no grupo BE (Gráfico 1).

3.3 Consumo de ração dos animais

Em relação ao consumo de ração, durante as 14 semanas de tratamento, houve diferenças significativas entre os grupos. O grupo ooforetomizado, alimentado com isoflavonas de soja nas concentrações de 100g/Kg e 200g/Kg de ração, mostrou aumento significativo no consumo de ração durante 12 semanas (BAHR et al. 2005). Analisou-se a utilização das isoflavonas de soja na dose de 100mg/Kg/dia durante o tratamento e houve redução signi-

ficativa no consumo de ração em relação aos outros grupos (Gráfico 2).

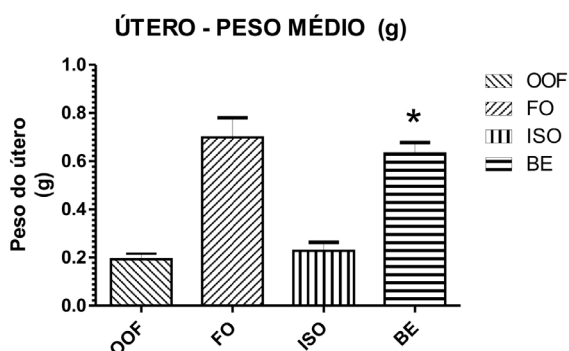
Gráfico 2- Quantidade de ração consumida por rata/por dia (g/d) em cada semana pelos grupos falso-operado (FO), ooforectomizado (OOF), isoflavonas (ISO) e benzoato de estradiol (BE), durante 14 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média ± erro padrão. * significa diferença do grupo OOF em relação ao ISO; #significa diferença do grupo OOF em relação ao BE; +significa diferença entre os grupos OOF e FO; x significa diferença entre o grupo ISO em relação ao FO e "significa diferença entre o grupo BE em relação ao FO. ANOVA, Newman Keuls, (p<0,05), n= 6 a 12



3.4 Peso uterino

Em relação às ratas ooforectomizadas, pode-se observar que houve aumento significativo do peso uterino nas que foram tratadas com benzoato de estradiol. As ratas tratadas com isoflavona apresentaram diferença significativa na redução do peso uterino quando comparadas às que receberam o tratamento hormonal (Gráfico 3).

Gráfico 3- Peso médio do útero(g) de ratas dos grupos falso-operado (FO), ooforectomizado (OOF), isoflavonas (ISO) e benzoato de estradiol(BE), após as 14 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média ± erro padrão. * significa diferença dos grupos ooforectomizados em relação ao grupo BE, p<0,05 (ANOVA, Newman Keuls)



Mosquete et al. (2006) observou que, para haver alterações uterinas, são necessárias doses iguais ou superiores a 300 mg/Kg/dia, quando utilizadas durante 21 dias. Porém, o uso de uma dose menor (100mg/Kg/dia), mesmo em período prolongado de tratamento, como realizado neste estudo, não induziu alterações uterinas, sugerindo que a capacidade de estimular o aumento do peso uterino está relacionada com a dose de isoflavonas utilizada.

3.5 Bioquímica

Segundo a análise de parâmetros séricos renais, hepáticos e glicose, não houve diferença significativa entre as ratas dos grupos FO, OOF, ISO e BE, sugerindo ausência de efeitos tóxicos hepáticos e renais pelo uso crônico de isoflavonas de soja e benzoato de estradiol nas doses e tempo de tratamento empregados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento crônico com isoflavonas de soja simula a ação hormonal fisiológica na frequência do ciclo estral, apresentando tanto fases estrogênicas, quanto progesterônicas. Pode-se observar também diminuição do ganho de peso ocasionado pelo hipoestrogenismo. Há ainda diminuição significativa do consumo alimentar. É possível se observar que não houve aumento macroscópico no útero das ratas tratadas com isoflavonas de soja quando comparadas com as tratadas com benzoato de estradiol, mantendo-se o peso uterino semelhante aos dos animais apenas ooforectomizados.

REFERÊNCIAS

BAHR, J. M.et.al. Dietary soy protein and isoflavones: minimal beneficial effects on bone and no effect on the reproductive tract of sexually mature ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause*. New York, v.12, n.2, p.165-173, mar. 2005.

CONCEIÇÃO, A.P.M. et al. Análise histológica da endometriose em ratas durante as fases do ciclo estral. *Arq. Inst. Biol*, 2005.

DIEL, P.; VOLLMER, G.; SCHMIDT, S. In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B.*, 2002.

IBGE. *Síntese dos indicadores sociais*. Brasília, DF, 2008.

HAN, K.K. et al. Efeito dos fitoestrógenos

sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v. 24, n 8, 2002.

KUIPER, G. G. et al. Clonig of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl.Acad.Sci*, USA, n. 93, p. 5925-30, 1996.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNINO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, nov. 2002

MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil / Ethnomedicinal use of tea from *Morus nigra* L. in the treatment of the climacteric symptoms in women from Muriaé, Minas Gerais, BrazilHU rev;36, 2010.

MOSQUETE, R. et al. Efeito das isoflavonas sobre o miométrio de ratas adultas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, 2006.

MURKIES, A. L.; WILCOX, G.; DAVIS, S. R. Phytoestrogens. *J Clin. Endocrin. Metab.*, n 83, p. 297-303, 1998.

PANTALEÃO, J.A.S.et. al. *Efeito da tibulona sobre o endométrio de ratas castradas*. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.

v.31, n.3, p.124-130, mar. 2009.

PARDINI, D. Terapia hormonal da menopausa. *Arq Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 51, 2007.

PEDRO, A. O. et. al. Síndrome do climatério: inquérito populacional domiciliar em Campinas, SP. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.37, n.6, p. 735-742, 2003.

POLISSENI, J.; et al. Técnica de tunel em embriões de ratas wistar: avaliação da qualidade e da capacidade de desenvolvimento dos embriões. [s.l:s.n], 2009.

SHEARMAN, A. M. et. al. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *JAMA*. v.290, v.17, p.2263-2270, nov. 2003.

TAYLOR, J. M. Binding of an alpha 2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. [s.l: s.n], 2009.

TORREZAN, R. et. al. O tratamento com Isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.* v. 52, n. 9, p. 1489-1496, 2008.

VASCONCELLOS, L. S. et al. Influência da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. *Arq Bras. Endocrinol. Metab.*, 2004.