

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL
MESTRADO ACADÊMICO

PAULA DE LOURDES LAUANDE OLIVEIRA

**EFEITOS DAS ISOFLAVONAS DE SOJA SOBRE OS EPITÉLIOS MAMÁRIO E
ENDOMETRIAL DE RATAS OOFORECTOMIZADAS**

São Luís-MA

2008

PAULA DE LOURDES LAUANDE OLIVEIRA

**EFEITOS DAS ISOFLAVONAS DE SOJA SOBRE OS EPITÉLIOS MAMÁRIO E
ENDOMETRIAL DE RATAS OOFORRECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciane Maria
Oliveira Brito

São Luís-MA

2008

Oliveira, Paula de Lourdes Lauande.

Efeito das isoflavonas de soja sobre os epitélios mamário e endometrial de ratas ooforectomizadas / Paula de Lourdes Lauande Oliveira. – São Luís, 2008.

61 f.

Impresso por computador (Fotocópia)

Orientadora: Luciane Maria Oliveira Brito

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, 2008.

1. Isoflavonas_Tratamento_Menopausa. 2. Mama. 3. Endométrio. I.
Título.

CDU 618.173

PAULA DE LOURDES LAUANDE OLIVEIRA

**EFEITOS DAS ISOFLAVONAS DE SOJA SOBRE OS EPITÉLIOS MAMÁRIO E
ENDOMETRIAL DE RATAS OOFORECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Oliveira Brito - Presidente
Universidade Federal do Maranhão
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Luís Alves Silva
Instituto Nacional do Câncer (INCA)- Rio de Janeiro
Examinador

Prof^a. Dr^a. Maria Bethânia da Costa Chein
Universidade Federal do Maranhão
Examinadora

Prof. Dr. José Albuquerque de Figueiredo Neto
Universidade Federal do Maranhão
Examinador

A Deus, cuja presença ilumina minha vida.

Aos meus pais que me orientaram a ir sempre em busca de novas conquistas e por todo empenho, dedicação e carinho confiado a toda minha vida.

À minha irmã, como exemplo e estímulo.

Ao meu marido pelo apoio, compreensão e paciência.

Aos meus filhos, pelo amor e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr^a. Luciane Maria Oliveira Brito, Coordenadora do Programa de Pós - Graduação em Saúde Materno Infantil, da Universidade Federal do Maranhão, pela força e dedicação em prol do fortalecimento deste Mestrado e pela orientação dedicada a este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges, pela orientação, competência, agilidade e oportunidade de desenvolver este trabalho e pelos incentivos constantes.

À Prof^a. Msc. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos, pelos seus valiosos ensinamentos relacionados à pesquisa e pela sua amizade incondicional.

À Prof^a. Msc. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes pela sua amizade, atenção e orientação na metodologia deste trabalho.

À Prof^a. Msc. Raimunda Ribeiro da Silva pela sua colaboração na avaliação histológica das peças, detalhismo e competência incomuns.

Ao Prof. Msc. Bismarck Ascar Sauaia pela sua atenção, colaboração e amizade.

A Prof^a. Dr^a Maria Bethânia da Costa Chein, pela experiência transmitida no decorrer do mestrado.

Aos amigos Franciely Spada e Paulo de Tarso que são exemplos de competência, garra, determinação e disciplina.

À Helena Ribeiro pela colaboração e paciência.

À FAPEMA pela bolsa concedida ao desenvolvimento do meu trabalho.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente das etapas de realização deste trabalho, possibilitando assim sua conclusão.

“[...] não gosto de lágrimas, ainda em olhos de mulheres, sejam ou não bonitas; são confissões de fraqueza, e eu nasci com tédio aos fracos. Ao cabo, as mulheres são menos fracas que os homens ou mais pacientes, mais capazes de sofrer a dor e a adversidade.”

Machado de Assis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p.
Figura 1 Fotomicrografia do tecido mamário de um animal do grupo operação simulada (SO)	35
Figura 2 Fotomicrografia do tecido mamário de um animal do grupo ooforectomizado (OOF).....	35
Figura 3 Fotomicrografia do tecido mamário de um animal do grupo ooforectomizados e tratados com isoflavonas (ISO)	36
Figura 4 Fotomicrografia do tecido mamário de um animal do grupo ooforectomizado e tratado com estroprogestativos (EP).....	36
Figura 5 Fotomicrografia do endométrio de um animal do grupo operação simulada (OS).....	37
Figura 6 Fotomicrografia do endométrio de um animal do grupo ooforectomizados (OOF).....	38
Figura 7 Fotomicrografia do endométrio de um animal do grupo ooforectomizado e tratado com isoflavonas (ISO).....	38
Figura 8 Fotomicrografia do endométrio de um animal do grupo ooforectomizado e tratado com estroprogestativos (EP).....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1	Evolução ponderal (g) de ratas dos grupos operação simulada (OS); ooforectomizado (OOF); isoflavonas (ISO) e estro-progestativo (EP), durante 24 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 10 animais por grupo experimental.....	p. 32
Gráfico2	Quantidade de ração (g) consumida por ratas dos grupos operação simulada (OS); ooforectomizado (OOF); isoflavonas (ISO) e estro-progestativo (EP), durante 24 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 10 animais por grupo experimental.....	33
Gráfico3	Valores médios do peso úmido do útero de ratas dos grupos operação simulada (OS); ooforectomizado (OOF); isoflavonas (ISO) e estro-progestativo (EP), após 24 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 10 animais por grupo experimental	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características citológicas das fases do ciclo estral de ratas Wistar <i>Rattus norvegicus</i> , variedade Albinus	p. 28
Tabela 2	Freqüências das fases do ciclo estral de ratas ooforectomizadas ou não e tratadas com isoflavonas de soja (ISO) ou estroprogestativo (EP) durante 24 semanas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EP	- Estro Progestativo
ERE's	- Elemento de Resposta ao Estrogênio
FSH	- Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	- Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HE	- Hematoxilina-Eosina
IMK	- Índice Menopausal de Kupperman
ISO	- Isoflavonas
LH	- Hormônio Luteinizante
OOF	- Oooforectomizadas
OS	- Operação Simulada
RE α	- Receptores Estrogênicos α
RE β	- Receptores Estrogênicos β
SERM's	- Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrogênio
TRH	- Terapia de Reposição Hormonal
UFMA	- Universidade Federal do Maranhão

RESUMO

Objetivo: Investigar o efeito do tratamento crônico com isoflavonas de soja, por via oral, no tecido mamário e uterino de ratas ooforectomizadas. **Metodologia:** Foram utilizadas 40 ratas da espécie *Rattus norvegicus*, distribuídas em 04 grupos: ISO- tratadas com isoflavonas de soja (10 mg/kg); EP- tratadas com estroprogestativo (0,5 mg/kg); OOF-ooforectomizadas e OS-operação simulada. Após a comprovação da regularidade do ciclo estral, as ratas dos grupos ISO, EP, OOF foram submetidas à ooforectomia. Após três semanas de comprovação de anestro, foram tratadas com isoflavonas (ISO) ou estrogênio conjugado (EP), por via oral, durante 6 meses. Os animais OOF e OS receberam soro fisiológico em propilenoglicol, durante o mesmo período de tempo. Foram determinados a frequência das fases do ciclo estral, o peso úmido do útero e analisada a histologia do tecido mamário e uterino. **Resultados:** Após seis meses de tratamento grupo ISO apresentou maturação vaginal, onde 88% dos esfregaços analisados se encontravam na fase estro. Quanto à histologia mamária, o grupo ISO apresentou atrofia ductal e fibrose peritubular. A análise do peso úmido do útero mostrou que a ooforectomia foi capaz de reduzir em 86,0% o peso desse órgão, cuja redução dos valores foi mantida após o tratamento com isoflavonas de soja. A histologia do útero de ratas tratadas com isoflavonas demonstrou o endométrio proliferativo com estroma denso. **Conclusão:** o uso crônico de isoflavonas de soja é capaz de estimular a maturação do epitélio vaginal e endometrial das ratas ooforectomizadas e manter a atrofia nas glândulas mamárias e redução do peso úmido do útero, causadas pela ooforectomia.

PALAVRAS-CHAVE: Isoflavonas. Menopausa. Mama. Endométrio.

ABSTRACT

Purpose: To investigate the effect of chronic treatment with soy isoflavones, orally, in breast and uterine tissue in rats of oophorectomized. **Methodology:** To evaluate the effect of isoflavones from soy in reproductive tissue, were used 40 rats of the species *Rattus norvegicus*, distributed in 04 groups: ISO-treated with isoflavones from soy (10 mg / kg); EP-treated with estrogen progestogen (0.5 mg / kg); OOF-oophorectomizadas and OS- simulated operation. After the proof of the regularity of the estrous cycle, the ISO groups of rats, EP, OOF were submitted to oophorectomy after three weeks of evidence of anoestrus, were treated with isoflavones (ISO) or estrogen combined (EP), orally, for 6 months. Animals OS and OOF received saline over the same period of time. There were certain stages of the frequency of the estrous cycle, the wet weight of the uterus and examine the histology of breast and uterine tissue. **Results:** After six months of treatment group had matured ISO vagina, where 88% of swabs tested were found during estrus. As for breast histology, the group presented ISO ductal atrophy and fibrosis peritubular. The analysis of the wet weight of the uterus showed that oophorectomy was able to reduce by 86.0% the weight of that body, whose reduction of the values was maintained after treatment with isoflavones from soy. The histology of the uterus of rats treated with isoflavones showed the endometrial proliferative with dense stroma. **Conclusion:** So the chronic use of soy isoflavones, is able to stimulate the maturation of the vaginal epithelium and endometrial in oophorectomized rats and maintain the atrophy in the mammary glands and reducing the wet weight of the uterus, caused by oophorectomy.

KEYWORDS: Isoflavones. Menopause. Breast. Endometrium.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	Menopausa e Terapia de Reposição Hormonal	15
2.2	Fitoestrogênios	17
2.3	Isoflavonas e Sistema Reprodutivo	19
3	OBJETIVOS	23
3.1	Geral	23
3.2	Específicos	23
4	MATERIAL	24
4.1	Animais	24
4.2	Drogas	25
4.2.1	Estroprogestativos	25
4.2.2	Isoflavonas de Soja	25
4.2.3	Salina (Solução Fisiológica 0,9%)/ Propilenoglicol 0,07%	25
4.3	Reagentes, sais e solventes	26
4.4	Aparelhagem	26
5	MÉTODOS	26
5.1	Tipo de Estudo	26
5.2	Local e período de realização do experimento	26
5.3	Crterios de inclusão dos animais	26
5.4	Ooforectomia	27
5.5	Tratamento dos animais	27
5.6	Determinação do ciclo estral	27
5.7	Determinação do peso corporal e consumo de ração de animais	28
5.8	Determinação do peso uterino	29
5.9	Avaliação histológica do epitélio mamário e endometrial	29
5.10	Análise Estatística	31
6	RESULTADOS	31
7	DISCUSSÃO	40
8	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

Na última década tem sido intensificado o uso de soja e de seus derivados pela população ocidental, devido aos benefícios que esses produtos têm apresentado na saúde das mulheres orientais, que tem como hábito o consumo diário de soja, principalmente no que se refere à diminuição dos sintomas e doenças que surgem ou que se agravam com o início da menopausa, tais como fogachos e labilidade emocional até estados mais graves como osteoporose e doenças cardiovasculares (MOSQUETTE et al, 2006).

Além dos benefícios mostrados pelo consumo de soja, outro motivo que tem contribuído para o aumento do interesse pelos produtos de soja é o abandono, pelas pacientes, da terapia estrogênica tradicional, a qual tem mostrado uma variedade de efeitos adversos (WOLFF et al, 2006).

Estudos clínicos, duplos cegos, com um número amostral de milhares de mulheres pós-menopausadas, demonstraram que um tratamento prolongado com estrogênio e acetato de medroxiprogesterona têm causado o aparecimento de pólipos endometriais e aumento da espessura do endométrio (CICINELLI et al, 2002; VAN DEN BOSCH et al, 2003).

Além de não contribuir com o desaparecimento de doenças cardiovasculares, têm intensificado a incidência de doenças cardíacas coronarianas em pacientes que fazem uso dessa terapia, determinando, dessa forma, os diversos transtornos que a terapia com estrogênio e progesterona podem trazer para as suas usuárias (MANSON et al, 2003).

Como os problemas advindos da terapia estrogênica conjugada e a qualidade de vida apresentado pela população oriental estão contribuindo para o aumento do uso de soja pelas pacientes do ocidente, muitos estudos têm surgido com a finalidade de se observar os efeitos benéficos que as substâncias presentes na soja, as isoflavonas, causam no organismo com hipoestrogenismo, tanto sobre os sintomas da menopausa quanto sobre estados mais graves resultantes dessa diminuição de estrogênio (CORNWELL et al, 2004; PELUSO, 2006;).

Vieira et al. (2007), avaliaram o efeito de um tratamento com 120 mg de isoflavonas diários, durante um período de seis meses, através de um questionário sobre sintomas vasomotores, psicossociais e sexuais de 32 pacientes pós-menopausadas, que eram assistidas no setor de climatério de uma Universidade.

Observaram que o tratamento foi capaz de amenizar os sintomas vasomotores em torno de 42,9%, psicossociais e sexuais respectivamente em 29,3% e 40,6%, semelhante ao grupo de 33 mulheres tratadas com estrogênios conjugados eqüinos.

De modo semelhante, Nahás et al (2003), avaliaram o efeito da administração de 60 mg diárias de isoflavonas sobre os sintomas da menopausa, por meio do Índice Menopausal de Kupperman (IMK), durante um tratamento de seis meses. Identificaram que no 4º mês de tratamento houve uma redução de 55% no índice menopausal das pacientes, indicando uma melhoria nos sintomas causados pela privação do estrogênio.

Além dos sintomas da menopausa, estudos têm demonstrado os efeitos benéficos das isoflavonas sobre doenças resultantes do estado de hipoestrogenismo, como osteoporose. Bonilla (2004), observou que as isoflavonas são capazes de aumentar o processo de absorção óssea por ativar a divisão celular em osteoblastos e aumentar a deposição de cálcio nas epífises.

Além da osteoporose, outros distúrbios derivados do hipoestrogenismo que são atenuados pelas isoflavonas de soja são as doenças cardiovasculares. Trabalhos têm indicado que esses fitohormônios são capazes de modular estados patológicos de aterosclerose (CLARKSON et al., 2001), de hipertrofia cardíaca (STAUFFER et al., 2006), de pressão arterial (HE et al., 2005; YANG et al., 2005) e reduzir valores séricos aumentados de LDL (NAHÁS et al., 2003).

Entretanto, Sacks et al (2006), por meio de metanálise com 22 estudos, afirmaram que as isoflavonas não possuem efeito terapêutico capaz de atenuar os sintomas da menopausa, exceto fogachos, diminuição clínica dos valores de LDL e redução da pressão arterial de pacientes. Concluíram então, que esses compostos não possuem a capacidade de atenuar com eficiência os incômodos trazidos com a privação de estrogênio.

Apesar dos dados que têm sido publicados atualmente, mostrando que o tratamento, com determinadas doses de isoflavonas, é eficaz para reverter o estado de atrofia genital, ao mesmo tempo em que é seguro o suficiente para não produzir alterações de crescimento e diferenciação celulares (cânceres) no sistema reprodutivo feminino, como nas mamas e útero (BONILLA, 2004), ainda se faz necessário, mais estudos que avaliem o efeito do uso crônico dessas substâncias em órgãos que podem sofrer alterações patológicas na presença de compostos estrogênicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Menopausa e Terapia de Reposição Hormonal

A menopausa é uma alteração fisiológica que ocorre no organismo feminino, caracterizada principalmente pelo hipoestrogenismo (diminuição acentuada dos níveis de estrogênio no organismo). É nessa fase que a mulher transita de um estado de organismo reprodutivo para um estado no qual a sua reprodutividade é nula (WOLFF et al, 2006; MOSQUETTE et al., 2005).

Essa redução intensa da concentração estrogênica no organismo feminino é decorrente da diminuição progressiva dos folículos ovarianos, cuja função é produzir e secretar estrogênio e, estimular a liberação do óvulo para o processo de fecundação. Devido à relação existente entre a quantidade de folículos com a secreção estrogênica, a diminuição dos folículos ovarianos acaba levando à insuficiência ovariana na produção hormonal (KEEP & LAURITZEN, 1975).

O principal motivo da diminuição no número de folículos ovarianos são as sucessivas ovulações que ocorrem nos ciclos sexuais femininos associadas à degeneração dos folículos que não liberam os óvulos para as tubas uterinas. Essa depleção folicular leva à redução da quantidade de tecido ativo produtor de hormônio (GUYTON & HALL, 2006; KEEP & LAURITZEN, 1975).

Todo esse processo regressivo é acompanhado de esclerose fisiológica dos vasos ovarianos, e deterioração no metabolismo e nos processos de troca nas glândulas, devido a um aumento no tecido conjuntivo. É desse modo que os ovários acabam, por fim, se atrofiando (KEEP & LAURITZEN, 1975).

A diminuição acentuada na produção e secreção de estrogênio leva à alteração na regulação dos sistemas de retroalimentação existentes no eixo hipotálamo-hipófise-ovários. O hipotálamo, dessa forma, aumenta a produção e secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e, por estímulo desse hormônio, a hipófise secreta quantidade 10 a 20 vezes maiores do hormônio folículo estimulante (FSH), e 5 a 10 vezes maiores de hormônio luteinizante (LH). A secreção dos hormônios hipofisários, entretanto, torna-se ineficiente, uma vez que os folículos ovarianos não são mais capazes de produzir estrogênios (KEEP & LAURITZEN, 1975).

Essa deficiência estrogênica altera a fisiologia de órgãos que são comumente estimulados pelos hormônios estrogênicos, levando ao aparecimento de sinais e sintomas decorrentes da fase climatérica, como os fogachos, sudorese intensa, nervosismo, irritabilidade, insônia, cefaléia, vertigem, depressão, labilidade emocional, formigamento, palpitações, mialgias, artralguas, osteoporose, doenças cardiovasculares e diminuição da libido (MOSQUETTE et al, 2005; WOLFF et al, 2006).

A deficiência de estrogênios no organismo humano também pode provocar distúrbios fisiológicos que alteram acentuadamente o estado de saúde da mulher, como o aparecimento de alterações osteoarticulares, como artralguas e osteoporose, e cardiovasculares, como maior incidência de doença cardíaca coronariana, alteração da pressão arterial, modificação do perfil lipídico, e aparecimento de aterosclerose (KHALIL, 2005). Devido a esses distúrbios, faz-se necessário encontrar meios de atenuar esses sintomas.

A terapia de reposição hormonal (TRH) se apresenta como uma alternativa para o controle dos sintomas do climatério: fogachos e sudorese, alterações cardiovasculares e osteoarticulares que são diminuídos acentuadamente, com o tratamento de reposição de estrogênios, isolados ou conjugados com algum progestágeno (BONILLA, 2004).

A terapêutica com hormônios, entretanto, é inadequada para pacientes nos quais foram diagnosticadas neoplasias dependentes de estrogênio, como carcinomas de mama e do endométrio, ou para pacientes que apresentam alto risco de desenvolvê-los (MOSQUETTE et al, 2005).

Estudo feito por Cicinelli et al (2002), sobre análise do efeito da TRH em mulheres pós-menopausadas, observaram que o endométrio aumentou sua espessura em 28%, após um ano de tratamento. Esses dados mostram que, apesar da TRH ser benéfica por atenuar os sintomas do climatério, ela pode também causar modificações na parede do útero, com conseqüente debilidade da saúde das pacientes em tratamento.

Além dos efeitos sobre o sistema reprodutivo feminino e das contra-indicações às pacientes com neoplasias hormônio-dependentes, o uso de TRH deve ser evitado em pacientes com sangramento genital não diagnosticado, hepatopatias, tromboembolismo, anemia falciforme, hipertensão arterial, doenças

cardiovasculares, diabetes mellitus, epilepsia, cefaléia ou enxaqueca e tabagismo (TOLOSA, 1998; MOSQUETTE et al,2005)

Wolff et al. (2006), relatam que há um receio das mulheres em relação às neoplasias, além das já conhecidas contra-indicações e intolerâncias medicamentosas, o que tem aumentado a não adesão ao tratamento hormonal.

Portanto, devido ao fato de a TRH se apresentar limitada às pacientes com deficiência hormonal, adicionado ao grande abandono destas à terapêutica conhecida, a atenção tem sido voltada à pesquisa de terapias alternativas que possam atenuar os sintomas da menopausa, sem causar os transtornos ligados à terapia tradicional (CORNWELL et al, 2004).

2.2 Fitoestrogênios

Os fitoestrogênios são compostos presentes em plantas com estrutura semelhante ao estrogênio. Existem cerca de 20 tipos desses compostos, identificados a partir de 300 plantas de 16 famílias diferentes, que podem ser agrupados em três classes: os coumestanos, os lignanos e as isoflavonas (BEDANI & ROSS, 2005).

Apesar de existirem um grande número de coumestanos, apenas uma pequena quantidade desses compostos tem demonstrado atividade estrogênica, predominantemente o coumestrol e o metoxicoumestrol. A principal fonte dietética de coumestrol são os legumes, contudo, baixos níveis têm sido encontrados em brotos e espinafres. Derivados de trevo e de soja se destacam em possuir altas concentrações de coumestrol, apresentando valores de 28mg e 7mg/100g de folhas secas, respectivamente (CORNWELL et al, 2004).

Estudos demonstram que o coumestrol possui a capacidade de modular o processo de “feedback” negativo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, atuando em receptores estrogênicos do tipo alfa (RE- α), encontrados no hipotálamo, o que leva à diminuição da liberação do hormônio hipotalâmico GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) (McGARVEY et al, 2001).

Já os lignanos são constituídos por uma diversidade de classes de dímeros e oligômeros de fenilpropanóide. Secoisolariciresinol e matairesinol são dois dímeros de lignanos que não possuem efeitos semelhantes aos estrogênios, mas são facilmente convertidos em outros lignanos, como enterodiol e enterolactona, os

quais possuem atividade estrogênica. A conversão ocorre por meio da flora intestinal e os lignanos transformados são facilmente absorvidos. Os fitolignanos aparecem em altas quantidades na linhaça, pães de grãos íntegros, vegetais e chás. Frutas, entretanto, possuem baixos níveis destes lignanos, com exceção de morangos (CORNWELL et al, 2004).

Vários estudos têm relacionado a ingestão de lignanos com a diminuição da incidência de doenças, como câncer de ovário (McCANN et al, 2003) e câncer de mama (PIETNEN et al, 2001). Também já foi observado, em outros estudos, o efeito dos lignanos nos níveis hormonais, com diminuição dos valores de estradiol e aumento dos níveis de prolactina (HUTCHINS et al, 2001).

As isoflavonas são os fitoestrogênios que possuem maior ação estrogênica. Nesse grupo se destacam a genisteína, a daidzeína e a gliciteína, presentes no gérmen de soja, na forma de seus respectivos glicosídeos: genistina, daidzina e glicitina. Os glicosídeos são hidrolisados no trato gastrointestinal, produzindo as isoflavonas agliconas e biologicamente ativas (WOLFF et al, 2006).

As isoflavonas de soja são compostos que possuem tanto ação estrogênica como antiestrogênica, e essa propriedade depende do tipo de receptor estrogênico ativado pelas isoflavonas (BONILLA, 2004).

Os receptores estrogênicos (RE) podem ser de dois tipos: os receptores estrogênicos- α (RE- α), presentes na mama e no útero, e os receptores estrogênicos- β (RE- β), presentes no tecido ósseo e no sistema cardiovascular. As isoflavonas têm apresentado mais afinidade de ligação aos receptores RE- β do que pelos RE- α (BONILLA, 2004).

Os receptores estrogênicos α e β apresentam 96% de homologia de seus aminoácidos constituintes, ainda que não é regra aplicável a todas as regiões do receptor, já que a região de união com o DNA é a que mais semelhança apresenta, enquanto que a região de união ao ligante só apresenta 53% de homologia (PÉREZ-RIVERO et al, 2007).

A ligação dos receptores estrogênicos com os estrogênios endógenos ou de origem vegetal induz a uma mudança na conformação do receptor, que ao mesmo tempo permite dissociar-se do complexo co-repressor e unir-se ao complexo co-ativador, o qual lhe confere atividade de transcrição de genes que contém elementos de resposta aos estrogênios (ERE's). Na ausência de estrogênio na

ligação ao RE, estes se associam com os co-repressores que inibem a atividade transcricional (PÉREZ-RIVERO et al, 2007).

2.3 Isoflavonas e Sistema Reprodutivo

Apesar de ter a capacidade de atuar em receptores estrogênicos, as isoflavonas possuem ação mínima sobre os receptores que o estradiol, fato que colabora para que as isoflavonas tenham efeitos estrogênicos ou não (RIMOLDI et al, 2007).

Uma forma de avaliar se as isoflavonas de soja possuem efeitos semelhantes aos estrogênios se baseia na análise dessas substâncias em órgãos que, reconhecidamente, são estimulados pelos hormônios sexuais, como epitélio vaginal (RIMOLDI et al, 2007).

Um modelo experimental que utiliza o epitélio vaginal como parâmetro é a análise do ciclo estral de ratas. O ciclo estral é um sistema ideal para observar as mudanças que ocorrem no epitélio vaginal durante o ciclo reprodutivo, pois, em ratas com maturidade sexual, ele é consideravelmente curto, com aproximadamente 4 dias de duração, quando comparado ao ciclo de outros mamíferos (MARCONDES et al, 2002).

O ciclo estral é caracterizado por quatro fases: proestro (12 horas), estro (24 horas), metaestro (24 horas), e diestro (24 - 48 horas). Durante essas fases, ocorre variação na concentração dos hormônios gonadotróficos e dos hormônios sexuais. O LH e FSH permanecem baixos e aumentam a partir da fase proestro. O estradiol tem o início de seu aumento na fase metaestro, com seu pico na fase proestro, diminuindo seus valores na fase estro. A progesterona, por sua vez, tem aumento de sua concentração entre as fases metaestro e diestro, apresentando-se diminuída posteriormente nas demais fases (LONG & EVANS, 1922).

Apesar de alguns pesquisadores observarem melhorias significativas no índice de maturação vaginal, com uma maior expressão dos efeitos locais de estrogênios, outros não encontraram modificações relevantes (MOLTABÁN, 2003, BONILLA, 2004).

Além do epitélio vaginal, outros órgãos que são estimulados quando expostos aos hormônios sexuais são o útero e as mamas.

As mamas são estruturas superficiais, que se apresentam mais proeminentes na parede torácica, principalmente nas mulheres. No organismo feminino, as glândulas mamárias são estruturas importantes no processo de reprodução. Elas estão rodeadas por um tecido conjuntivo, que se estende sob a forma de septos entre lobos e lóbulos. Esses septos acabam proporcionando sustentação para os elementos glandulares. Além de serem constituídos de tecido conjuntivo, os septos podem apresentar grande quantidade de tecido adiposo (MOORE et al, 2001).

A glândula mamária adulta, por sua vez, é uma glândula sudorípara modificada composta por 15 a 20 lobos irregulares de glândulas tubuloalveolares ramificadas, que se encontram presentes no tecido subcutâneo (TORTORA & GRABOWSKI, 2002). Os lobos formadores das glândulas estão subdivididos em numerosos lóbulos. Cada lobo termina em um ducto que se abre através de um orifício constringido no mamilo. Debaixo da aréola, área circular que envolve o mamilo, cada ducto possui uma região dilatada, chamada seio lactífero. Próximo à sua abertura, os canais são revestidos por epitélio escamoso estratificado (BLAND et al, 1994).

A morfologia da porção secretora da glândula mamária varia muito com a idade e com fases especiais do organismo da mulher, como gravidez e lactação. Durante a puberdade, as mamas crescem em razão do desenvolvimento glandular e da deposição aumentada de tecido adiposo e conjuntivo. As aréolas e papilas mamárias também aumentam. Os ductos lactíferos dão origem a brotamentos, que são os lóbulos. No ciclo menstrual a estrutura histológica dessas glândulas sofre algumas alterações: ocorre acentuada proliferação das células ductais no período da ovulação, quando o estrogênio circulante está no seu pico de secreção, seguida de uma diminuição da capacidade proliferativa e maior amadurecimento lóbulo-alveolar, quando aumenta os níveis de progesterona no organismo (GUYTON & HALL, 2006).

Durante a gravidez e lactação as glândulas se proliferam e tem alargamento acentuado, devido ao desenvolvimento dos alvéolos nas extremidades dos ductos interlobulares terminais (BLAND et al, 1994). Essas alterações são influenciadas pela ação sinérgica de vários hormônios, principalmente dos hormônios estrogênicos, progesterona, prolactina e lactogênio placentário humano. Quando chega o período de desmame, a maioria desses alvéolos desenvolvidos sofre degeneração por apoptose (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; ROBBINS et al,

2005). No período da menopausa estes hormônios têm sua liberação diminuída, o que provoca uma involução das glândulas mamárias, caracterizada por atrofia de porções secretoras e de ductos, concomitante com modificação atrófica dos tecidos conjuntivo interlobular (STEPHEN, 1997).

Devido a essa capacidade das mamas de serem estimuladas por hormônios sexuais, a análise dos efeitos das isoflavonas sobre esse tecido alvo se mostra um bom parâmetro para elucidar a provável semelhança de efeito biológico desses fitohormônios com os estrogênios endógenos. Em um estudo, realizado por Mosquette et al (2005), que administraram isoflavonas em ratas ooforectomizadas, foi observado que o número e o volume dos alvéolos, e o número de vasos sanguíneos mamários, os quais são indicadores de alteração e distúrbios teciduais, permaneceram inalterados após um tratamento de 2 meses consecutivos. Atkinson e Bingham (2002) demonstraram que a suplementação com soja diminuiu a densidade da mama, enquanto que o tratamento com estrógeno provocou o seu aumento. Majandanatha et al (2006), quando analisava os efeitos das isoflavonas sobre a mutagênese mamária, demonstraram que genisteína e daidzeína juntas, são capazes de reduzir as lesões provocadas por substâncias cancerígenas em ratas.

Entretanto, Maskarinec et al (2004), verificaram que mulheres pós-menopausadas, quando consumiam isoflavonas por um longo período, apresentavam densidade mamária aumentada em relação àquelas que consumiam por períodos mais curtos. Portanto, é notório que a falta de evidências sobre os reais efeitos das isoflavonas nas mamas exige que mais pesquisas sejam realizadas a fim de elucidar a existência ou não de efeitos proliferativos.

Assim como a mama, outro órgão hormônio-dependente que serve como parâmetro para análise do efeito das isoflavonas de soja é o útero (RIMOLDI et al, 2007).

O útero é um órgão muscular oco, piriforme e de paredes espessas, que está situado na pelve menor, onde seu corpo está alojado no topo da bexiga urinária e seu colo entre a bexiga urinária e o reto (MOORE & DALLEY, 2001). Histologicamente, este órgão é formado por três lâminas de tecido: perimétrio, miométrio e endométrio. Este último compõe a camada mais interna do útero, se apresentando muito vascularizada e composto de uma camada de epitélio colunar simples, que reveste o lúmen; um estroma endometrial subjacente (tecido

conjuntivo) e glândulas endometriais que invaginam até o miométrio (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

A camada endometrial, que previamente se apresentava proliferada e ricamente irrigada pela ação estimulatória do estrogênio fisiológico, modifica-se, após a menopausa, para um epitélio simples, sem presença de um estímulo para a proliferação e, conseqüentemente, sem novos vasos sanguíneos para irrigar esse epitélio não proliferado (MOSQUETTE et al, 2006).

Em um estudo realizado com mulheres pós-menopausadas, que consumiram drágeas de 114 mg de isoflavonas de soja diariamente, durante três meses, não foi observado nenhuma modificação na espessura endometrial, na histologia uterina, e na expressão gênica de fatores, como receptores de estrogênio e progesterona, e marcadores de proliferação endometrial (ki-67), mostrando que isoflavonóides não atuam em estado proliferativo no útero (NIKANDER et al, 2004).

Entretanto, Garcia-Pérez et al (2006), que analisaram o efeito da genisteína na histologia e peso uterinos, de camundongos fêmeas ooforectomizadas, observaram propriedade agonista parcial, indutora da apoptose e atipias no epitélio glandular endometrial, o que caracteriza um efeito proliferativo de distúrbios celulares a partir da isoflavona.

Mosquette et al. (2006), observaram que administrações de 300mg/kg de isoflavonas de soja podem induzir o aumento na espessura e no número de vasos sanguíneos no miométrio de ratas adultas e, 10mg/kg, são incapazes de provocar alterações estruturais neste órgão.

A ausência de conclusões definitivas sobre os reais efeitos das isoflavonas de soja sobre o aparelho reprodutor feminino e a escassez de pesquisas com tratamento prolongado justificam a realização de novos estudos para melhor elucidar a função desses fitoestrogênios, quando utilizados como uma terapia hormonal alternativa.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o efeito do tratamento com isoflavonas de soja, por via oral, no tecido epitelial mamário e endometrial de ratas ooforectomizadas, durante um período de seis meses.

3.2 Específicos

Determinar em ratas ooforectomizadas o efeito do tratamento crônico com isoflavonas de soja:

- Na maturação do epitélio vaginal;
- No peso corporal e o consumo de alimento;
- No peso úmido do útero;
- Na histologia do epitélio mamário e endometrial;

4. MATERIAL

4.1 Animais

Para o desenvolvimento deste estudo experimental foram utilizadas ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Albinus, provenientes do Biotério da UFMA. Foram selecionadas 40 ratas adultas, com aproximadamente 60 dias de idade, pesando entre 250 e 300 gramas, com acesso *ad libitum* à ração e água e, mantidas em ambiente controlado com ciclos alternados de luminosidade de 12 horas, e temperatura variando entre 20 e 25° C.

Estes animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais, conforme descrição a seguir:

a) Grupo operação simulada (OS, n=10): as ratas foram submetidas a uma operação simulada, ou seja, foi realizada uma incisão de aproximadamente 2cm na linha mediana, supra-púbica, e em seguida foi realizado a sutura, sem haver a retirada dos ovários. Após 21 dias da intervenção cirúrgica foi iniciada a

administração diária de soro fisiológico em propilenoglicol 0,07%, em volume de 0,1mL/100g de peso dos animais, por via oral, por um período de 24 semanas;

b) Grupo ooforectomizado (OOF, n=10): os ovários das ratas foram retirados, conforme técnica descrita a seguir (item 5.4). Os animais receberam, soro fisiológico (0,1 mL/100g) em propilenoglicol 0,07%, diariamente, por via oral, durante 24 semanas;

c) Grupo estroprogestativo (EP, n=10): neste grupo experimental os animais foram ooforectomizados (item 5.4) e após os 21 dias da cirurgia, foram tratados diariamente, com solução de estroprogestativos (associados estradiol 1mg/acetato de noretisterona 0,5 mg), na dose de 0,5 mg/Kg de peso do animal, por via oral, durante 24 semanas.

d) Grupo isoflavonas (ISO, n=10): neste grupo experimental os animais foram submetidos à ooforectomia (item 5.4) e após os 21 dias da cirurgia, foram tratados diariamente, com solução de isoflavonas de soja, na dose de 10 mg/Kg de peso do animal, por via oral, por um período de 24 semanas.

4.2 Drogas

4.2.1 Estroprogestativos

Foram utilizados na forma de comprimidos contendo estradiol (1 mg) associado ao acetato de noretisterona (0,5 mg) com o nome comercial de NATIFA PRO®, cedidas gratuitamente pelo Laboratório LIBBS GINECOLOGIA. O conteúdo do comprimido foi submetido à fragmentação e pulverização, sendo dissolvido e solubilizado em soro fisiológico com propilenoglicol 0,07%, até a concentração de 0,5 mg/mL de estradiol e 0,25mg/ml de acetato de noretisterona.

4.2.2 Isoflavonas de soja

Foram utilizadas na forma de cápsulas gelatinosas contendo extrato seco de *Glycine max* (60 mg) com o nome comercial de SOYFEMME®, cedidas gratuitamente pelo Laboratório ACHÉ. O conteúdo das cápsulas de isoflavona foi extraído por ruptura do invólucro gelatinoso, e posteriormente dissolvido e

solubilizado em soro fisiológico com propilenoglicol 0,07%, até a concentração de 10 mg/mL.

4.2.3 Soro fisiológico (solução fisiológica 0,9%) / propilenoglicol 0,07%,

A solução fisiológica 0,9% com propilenoglicol 0,07% foi o veículo utilizado para dissolução das drogas e administrado nos animais do grupo operação simulada (OS) e ooforectomizado (OOF) (MOSQUETTE et al,2005).

4.3 Reagentes, sais e solventes

Propilenoglicol (Alquimia), Xilazina (Konig), Eosina (EA 36), Hematoxilina de Harris, Orange (New prov), Polivinil-pirrolidona-iodo (Povidine), Formol 10% (Ritiec), Cetamina (Syntec), Cloreto de Sódio, Etanol, Éter Etilico (Vetec).

4.4 Aparelhagem

- Balança Analítica (SARTORIUS)
- Balança digital (AND)
- Microscópio óptico (OLYMPUS)
- Banho-Maria (TERMOMIX)
- Espectrofotômetro (BIOPLUS)
- Espectrofotômetro (ABBOT)
- Micrótomo (MINOT)

5. MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo experimental do tipo randomizado.

5.2 Local e período de realização do experimento

Este experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Maranhão, localizada no Campus do Bacanga, no período de Abril de 2007 a Abril de 2008.

5.3 Critérios de inclusão dos animais

A primeira etapa do estudo, com duração de uma semana deteve-se à adaptação e seleção dos animais oriundos do Biotério da UFMA. Nesta fase foi realizada a determinação do ciclo estral das ratas, pela análise do esfregaço vaginal, para selecionar os animais que apresentavam ciclo regular, ou seja, as quatro fases estrais: proestro, estro, metaestro e diestro. Além disso, foram determinados o peso corporal e o consumo de ração dos animais.

5.4 Ooforectomia

Neste procedimento, as ratas foram anestesiadas, com a associação de Cetamina (60 mg/Kg) e Xilazina (7,5 mg/kg), por via intramuscular. Foi realizada a tricotomia, e a assepsia de região ventral dos animais (supra-pública), e posteriormente a laparotomia de aproximadamente 2cm na linha mediana. 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).

5.5 Tratamento dos animais

Após 21 dias da ooforectomia e comprovação do anestro, pela análise do esfregaço vaginal, todos os animais foram tratados, por via oral, com introdução direta da substância no esôfago do animal (método de gavagem), diariamente, por um período de 24 semanas, com veículo (salina 0,9%/ propilenoglicol 0,07%), isoflavonas de soja (10 mg/Kg) ou estroprogestativo (0,5 mg/Kg), conforme descrito na distribuição dos grupos experimentais no item 4.1.

5.6 Determinação do ciclo estral

A determinação do ciclo estral foi realizada através da análise do esfregaço vaginal coletado e corado diariamente. A coleta do material vaginal foi realizada sempre entre 8 e 10 horas da manhã (DIEL et al, 2002). A secreção vaginal foi colhida com o auxílio de uma cureta, introduzida na vagina das ratas em profundidade de aproximadamente 0,5 cm do intróito.

O material colhido foi colocado em lâmina de vidro na forma de camada fina e corado pela técnica Papanicolaou (FEITOZA, 2003). Posteriormente foi observado as características celulares com auxílio do microscópio óptico, para a identificação das fases do ciclo estral (Tabela 1).

Tabela 1: Características das fases do ciclo estral de ratas Wistar *Rattus norvegicus*, variedade Albinus

FASES DO CICLO ESTRAL	CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO ESFREGAÇO VAGINAL
Proestro (12 horas)	Presença de numerosas células epiteliais nucleadas, raras ou freqüentes células cornificadas (anucleadas) e raros leucócitos. Presença de muco.
Estro (24 horas)	Numerosas células cornificadas. Ausência de células epiteliais nucleadas ou de leucócitos.
Metaestro (24 horas)	Igual proporção entre células cornificadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos.
Diestro (24 - 48 horas)	Numerosos leucócitos e com raras células epiteliais nucleadas.

Fonte: MARCONDES, et al (2002)

5.7 Determinação do peso corporal e consumo de ração de animais

Durante todo o período do experimento foram realizados o controle do peso corporal e consumo de ração das ratas. O peso corporal foi determinado por meio da pesagem dos animais, três vezes por semana, sendo este parâmetro utilizado para acompanhar o desenvolvimento ponderal das ratas e, também para a determinação do volume das drogas que eram administradas diariamente.

A ingesta de ração dos animais foi determinada em dias alternados na semana, sendo ofertada diariamente, 300g de ração. As sobras de ração foram

pesadas e subtraídas pela quantidade total ofertada. Com base neste cálculo foi determinado o consumo de ração diário, por gaiola de animais, cuja quantidade em cada era de cinco ratas.

5.8 Determinação do peso uterino

Após a eutanásia das ratas, por exsanguinação, o intestino foi rebatido para melhor exposição dos cornos uterinos, que foram isolados em conjunto. Posteriormente, foi retirada toda a gordura aderida na extensão dos dois lobos, para em seguida, ser realizada a determinação do peso úmido, em balança analítica.

5.9 Avaliação histológica dos epitélios mamário e endométrio

O útero e as mamas foram retirados para a obtenção de cortes histológicos. Estes órgãos foram fixados em formol 10%, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizado pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa, regulada a temperatura de 59°C para a formação de blocos, segundo o método preconizado por MASSON (1956). Os blocos foram submetidos a cortes seriados de 5 micrômetros de espessura, em micrótomo do tipo Minot. Estes foram desparafinizados e corados em lâmina pela técnica hematoxilina e eosina (HE). Posteriormente, foram avaliados a mama e o endométrio por um único patologista, em microscópio óptico de luz comum, sem que ele conhecesse a terapêutica a que cada rata havia sido submetida.

Para a avaliação histológica dos tecidos epiteliais mamário e endometrial foi realizada somente a análise qualitativa, sendo considerado como critérios a atrofia, proliferação epitelial dos tecidos e alterações celulares.

Mudanças ocorrem na mama madura associada com ciclo menstrual, gravidez, lactação e menopausa. Uma acentuada variação ocorre no padrão de epitélio e estroma observado na mama menopausada, paralelamente à grande modificação nos níveis hormonais pós-menopausa (STEPHEN, 1997). As glândulas mamárias de ratas possuem morfologia com formação de ductos e alvéolos como nas mulheres e também, comportamento citogenético similar, constituindo a melhor opção em modelo experimental para pesquisa (SHIDA, 2001).

Elas podem se apresentar atroficas (em repouso), exibindo menor concentração de ductos e alvéolos, pouco desenvolvidos e com secreção escassa ou ausente (SILVA, 2000). Os ductos mamários apresentam-se imersos em grande concentração de tecido adiposo (PIOVESAN, 2005).

Na fase folicular precoce de uma mama normal, o epitélio que reveste os ácinos é composto por duas a três camadas de células com lúmen mal definido. As células epiteliais ácinas são pequenas e poligonais, com citoplasma fracamente eosinofílico e escuro, com núcleo centralizado. O estroma é denso (STEPHEN, 1997).

Ao entrar na fase secretora, as glândulas mamárias têm seu parênquima glandular abundante com proliferação de lóbulos mamários contendo os alvéolos. Há uma vacuolização e aumento do glicogênio dentro das células mioepiteliais. O lúmen está aumentado e com produtos de secreção (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O endométrio da rata e da mulher apresentam alterações proliferativas semelhantes quando submetidas à terapia hormonal tradicional estro-progestativa, sendo portanto o uso do modelo animal válido para o estudo destas alterações (PANTALEÃO, 2009). O tecido endometrial tem uma constante mudança de padrões normais que dependem da natureza e da intensidade da variação hormonal, que ocorrem ao longo da vida (CONCEIÇÃO, 2005).

A fase proliferativa ou estrogênica é caracterizada por glândulas formadas por um epitélio colunar simples, cujas células têm relação núcleo citoplasma alta. O citoplasma é escasso e os núcleos alongados e de cromatina densa. Figuras mitóticas são comuns nas células que compõem a glândula. Estas células estão presentes durante toda a fase proliferativa e até mesmo no início da fase secretória (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A fase secretória é caracterizada pelas células que começam a acumular glicogênio na porção infranuclear e os produtos da secreção dilatam o lúmen das glândulas, que se tornam muito tortuosas (STEPHEN, 1997).

Entretanto na fase atrofica, o endométrio se apresenta revestido de um epitélio constituído por células pavimentosas ou cúbicas, contendo núcleos esféricos, pequenos e heterocromáticos (MORAES et al, 2006). Figuras mitóticas

não estão presentes. Geralmente tem diferenciação citoplasmática não específica, embora ocasionalmente possam aparecer cílios (STEPHEN, 1997).

5.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste Newman - Keuls (SOKAL e ROLF, 1969), considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Determinação do ciclo estral

Os resultados apresentados na tabela 2 mostram as freqüências percentuais das fases do ciclo estral dos grupos estudados durante 24 semanas de tratamento.

O grupo isoflavonas se apresentou predominantemente na fase estro (88%), na qual a característica citológica consiste principalmente no aumento de células cornificadas, devido os altos níveis estrogênicos, assim como o grupo estroprogestativo (84,8 % na fase estro).

Tabela 2: Freqüência relativa do ciclo estral de ratas operação simulada (OS), ooforectomizadas (OOF) e tratadas com isoflavonas de soja (ISO) ou estroprogestativo (EP) durante 24 semanas.

Grupos de Tratamento	Freqüências do ciclo estral (%)			
	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
OS	19,1	47,2	27,8	5,9
OOF	7,7	28,5	38,1	25,6
ISO	2,2	88,0	9,7	0,1
EP	3,3	84,8	10,3	1,7

6.2 Determinação do peso corpóreo e consumo de ração de animais

Após três semanas os animais ooforectomizados apresentaram aumento do peso corporal em relação ao grupo operação simulada, sendo a média de peso $241,38g \pm 0,98$ e $272,95g \pm 1,15$ dos ooforectomizados.

A análise comparativa do desenvolvimento ponderal entre os grupos de animais revelou diferença significativa entre os grupos que foram ooforectomizados e submetidos ou não ao tratamento com isoflavonas ou estroprogestativos com o grupo operação simulada, em que não houve a retirada dos ovários. A ooforectomia determinou aumento de peso corporal dos animais.

Porém, o grupo que apresentou maior aumento da massa corporal foi o ooforectomizado não tratado, cujo aumento ocorreu logo após as primeiras semanas de tratamento. O uso de isoflavonas de soja e de estroprogestativo reduziu o ganho de peso promovido pela ooforectomia mantida até o final do tratamento (Gráfico 1).

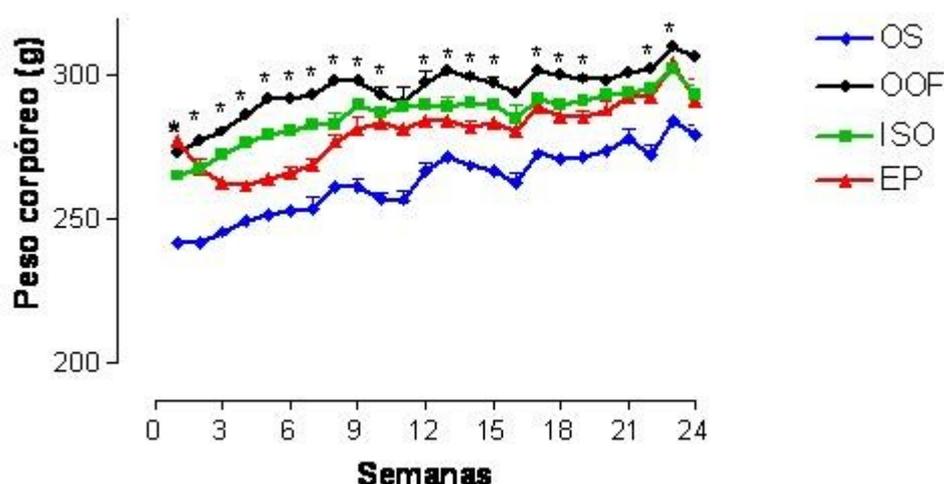


Gráfico 1 – Evolução ponderal (g) de ratas dos grupos isoflavonas (ISO), estroprogestativo (EP), ooforectomizado (OOF) e operação simulada (OS), durante 24 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 10 animais por grupo experimental. *significa diferença entre o grupo OOF com os grupos ISO, EP, OS $p < 0,05$ (ANOVA, Newman Keuls)

Em relação ao consumo de ração, durante as vinte e quatro semanas de tratamento, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, conforme demonstrado no gráfico 2.

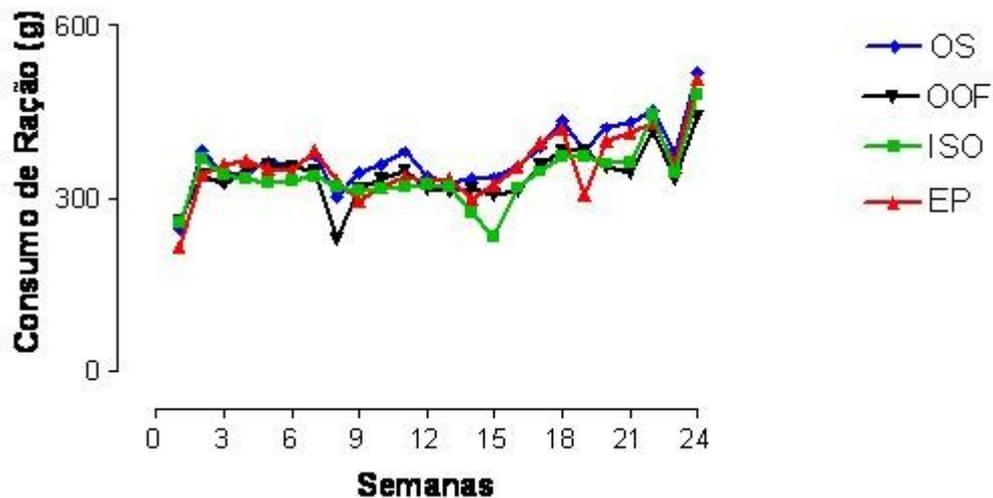


Gráfico 2 – Quantidade de ração (g) consumida por ratas dos grupos operação simulada (OS), ooforectomizados (OOF), isoflavonas (ISO) e estro-progestativo (EP), durante 24 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 10 animais por grupo experimental. ANOVA, Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

6.3 Determinação do peso úmido do útero

No grupo OS o peso uterino foi $0,79 \pm 0,06$ g. A ooforectomia promoveu a redução do peso do útero das ratas em 86,0%. O tratamento dos animais com isoflavonas não induziu aumento no peso do útero, mantendo a redução observada com a retirada dos ovários (gráfico 3). Porém, o útero dos animais que foram tratados com o estroprogestativo apresentou-se aumentado com o peso de $0,38 \pm 0,08$ g, o que corresponde a 52% de aumento em relação ao útero do grupo ooforectomizados.

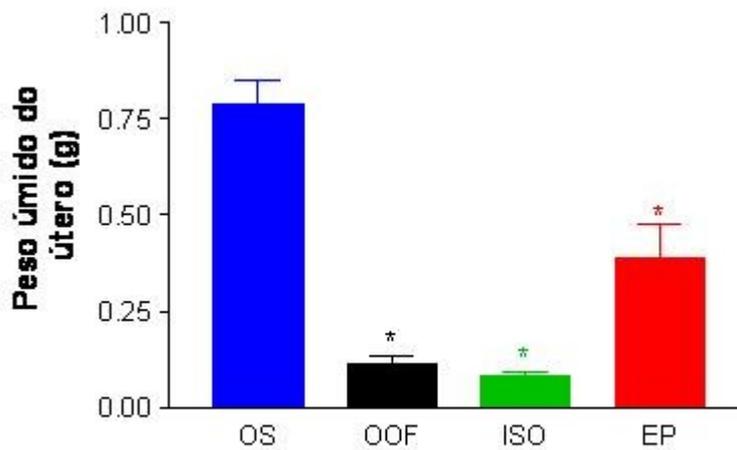


Gráfico 3 – Valores médios do peso úmido do útero de ratas dos grupos operação simulada (OS), ooforectomizado (OOF), isoflavonas (ISO) e estro-progestativo (EP), após 24 semanas de tratamento. Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 10 animais por grupo experimental. *significa em relação ao grupo OS, $p < 0,05$ (ANOVA, Newman Keuls).

6.5 Avaliação histológica do epitélio mamário e endometrial

Após seis meses de tratamento, foi realizada a análise histológica do tecido mamário em todos os animais dos grupos experimentais. No grupo de ratas operação simulada (OS), foi observada a presença de vacúolos com material amorfo, fibrose periductal e adenose, na qual também teve fibrose, porém os ductos proliferam tornando-se muito pequenos, dispostos lado a lado, esboçando uma estrutura lobular (Figura 1). As ratas do grupo ooforectomizadas (OOF) apresentaram um epitélio mamário tipicamente atrófico (Figura 2). De modo semelhante, o grupo ISO, das ratas tratadas com isoflavonas de soja, também apresentou um epitélio mamário tipicamente atrófico: com freqüente atrofia ductal, fibrose peritubular e infiltração adiposa (Figura 3). As ratas pertencentes ao grupo estroprogestativo (EP), entretanto, apresentaram alterações morfológicas como metaplasia apócrina (mudança de epitélio simples para epitélio apócrino) e ectasia ductal (dilatação ou distensão de ductos mamários) (Figura 4).

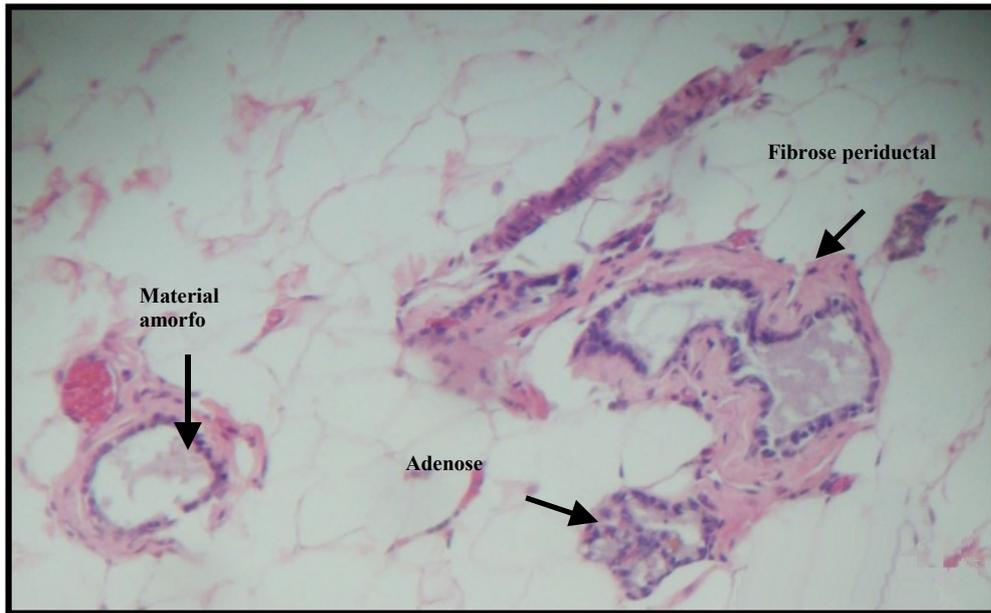


Figura 1 – Fotomicrografia do tecido mamário de uma rata do grupo operação simulada (OS). Presença de fibrose periductal, adenose e vacúolo com material amorfo. Aumento de 40X em coloração HE.

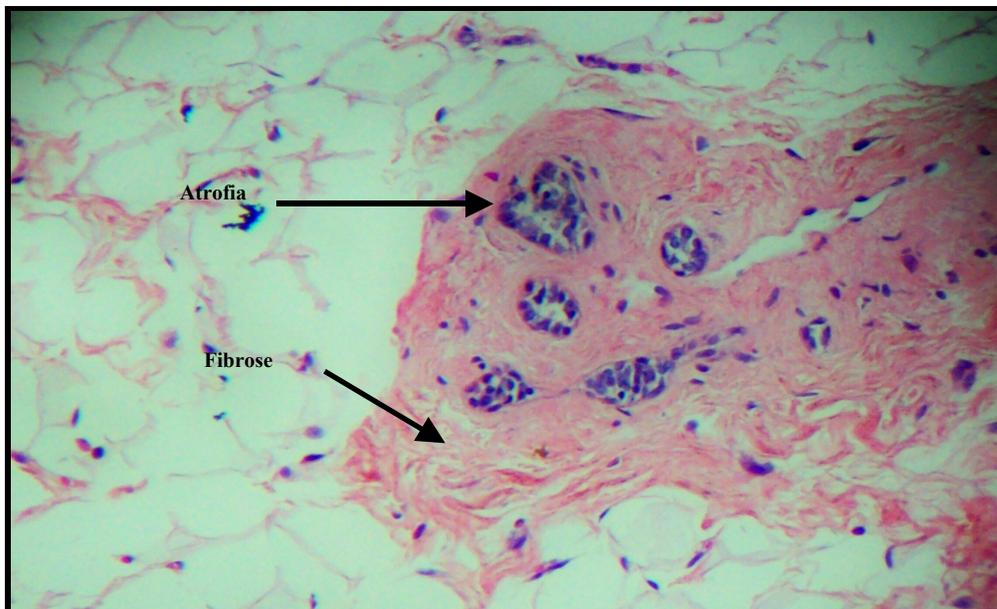


Figura 2 – Fotomicrografia do tecido mamário de uma rata do grupo ooforectomizado(OOF). Presença de fibrose e atrofia. Aumento de 40X em coloração HE.

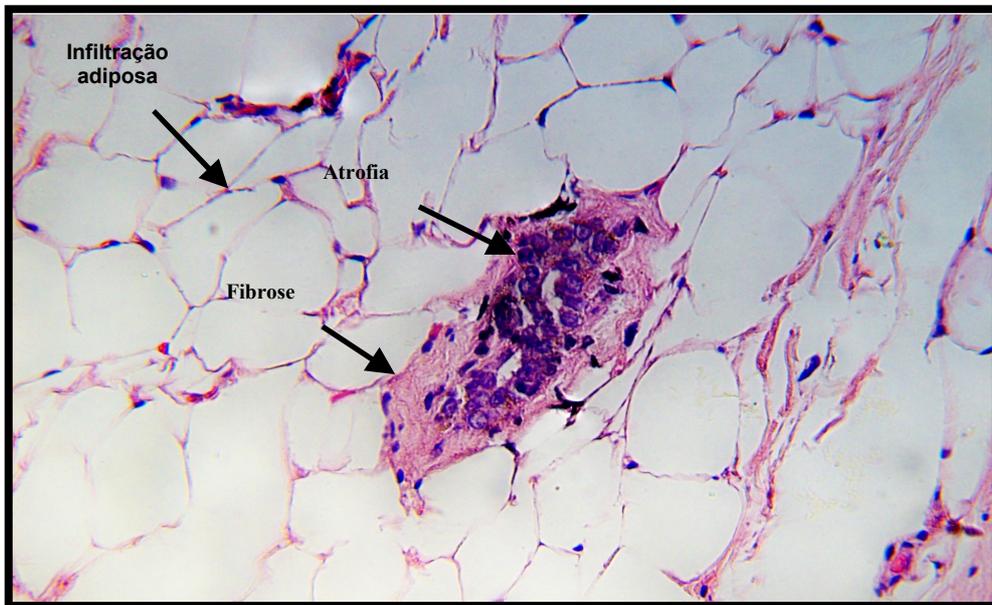


Figura 3 – Fotomicrografia do tecido mamário de uma rata do grupo ISO (ooforectomizados e tratados com isoflavonas de soja, 10mg/kg, v.o., durante 24 semanas). Presença de atrofia ductal, fibrose peritubular e infiltração adiposa. Aumento de 40X em coloração HE.

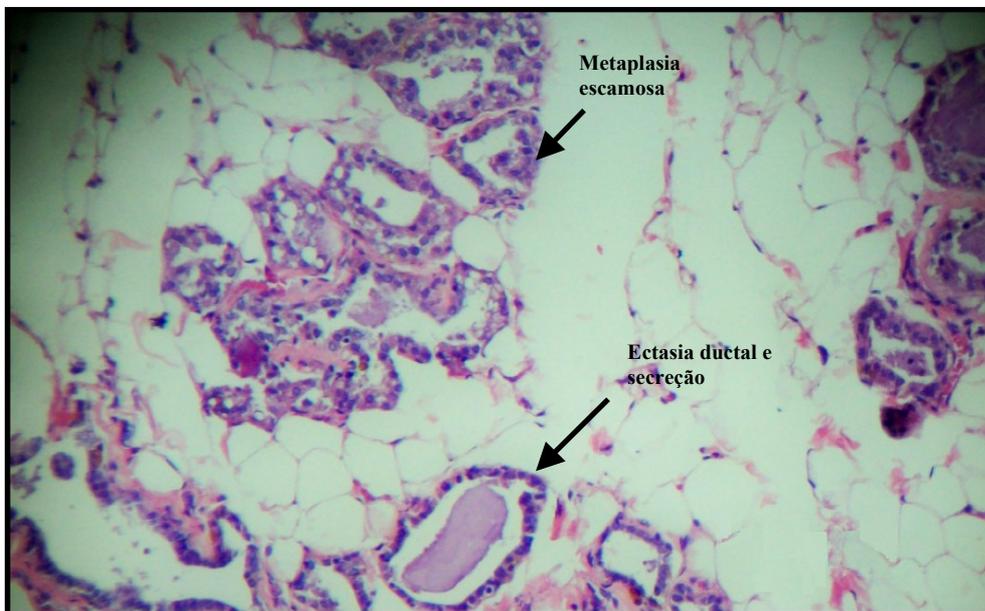


Figura 4 – Fotomicrografia do tecido mamário de rata do grupo EP (ooforectomizados e tratados durante 24 semanas, v.o., com estrogênios conjugados 0,5 mg/kg). Presença de metaplasia apócrina, ectasia ductal com secreção. Aumento de 40X em coloração HE.

Com relação ao tecido endometrial, nas ratas em que foi realizada a falsa cirurgia (OS), o epitélio endometrial da maioria dos animais se apresentou proliferativo com estroma denso (Figura 5). Os animais pertencentes ao grupo ooforectomizado apresentaram um epitélio tipicamente atrófico, caracterizado pela presença de glândulas de pequeno tamanho e constituídas por epitélio cubóide e com estroma denso (Figura 6).

De modo semelhante às ratas em que os ovários foram preservados (OS), os animais tratados com isoflavonas de soja (ISO) apresentaram o endométrio proliferativo com estroma denso, presença de glândulas tortuosas e um número pequeno contendo vacúolo com secreção (Figura 7). Porém, nos animais do grupo tratado com estroprogestativo (EP) foram evidenciadas uma maior diversidade e freqüência de alterações nas células endometriais como metaplasia escamosa, e hiperplasia glandular cística. Além disso, as ratas apresentaram distúrbios mais agravantes, como alterações do tipo “back to back”, que são caracterizadas por glândulas justapostas entre si (Figura 8).



Figura 5 – Fotomicrografia de corte histopatológicos de endométrio de rata do grupo operação simulada (OS), após 24 semanas de tratamento. Visualizar o epitélio glandular proliferativo com estroma denso. Aumento de 40x em coloração HE.

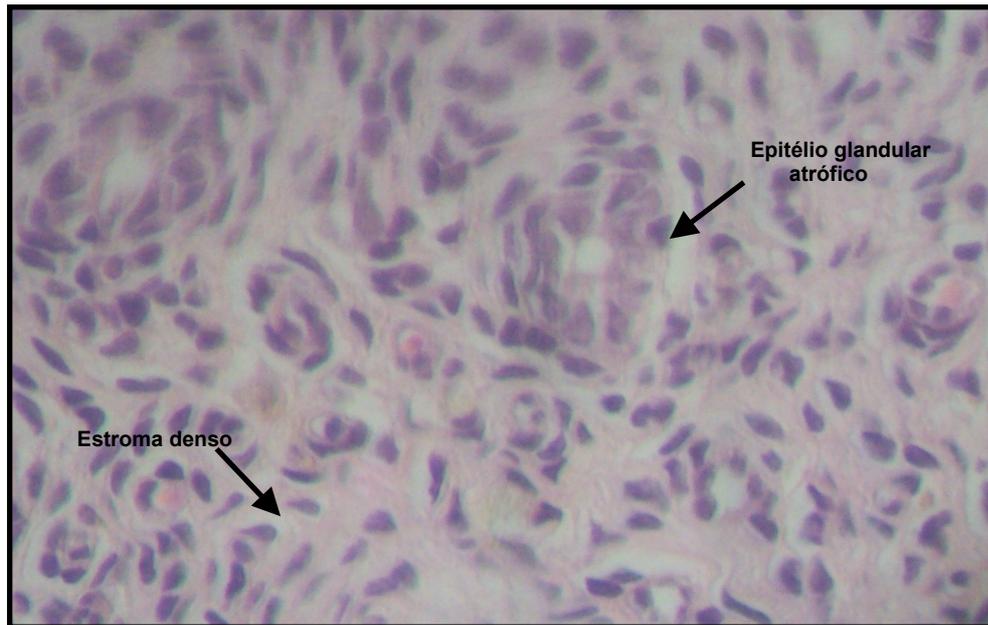


Figura 6 – Fotomicrografia de corte histopatológico de endométrio de rata do grupo ooforectomizado (OOF) não tratado, após 24 semanas. Observar glândulas de tamanho pequeno com células cúbicas simples e estroma denso. Aumento de 40x em coloração HE.

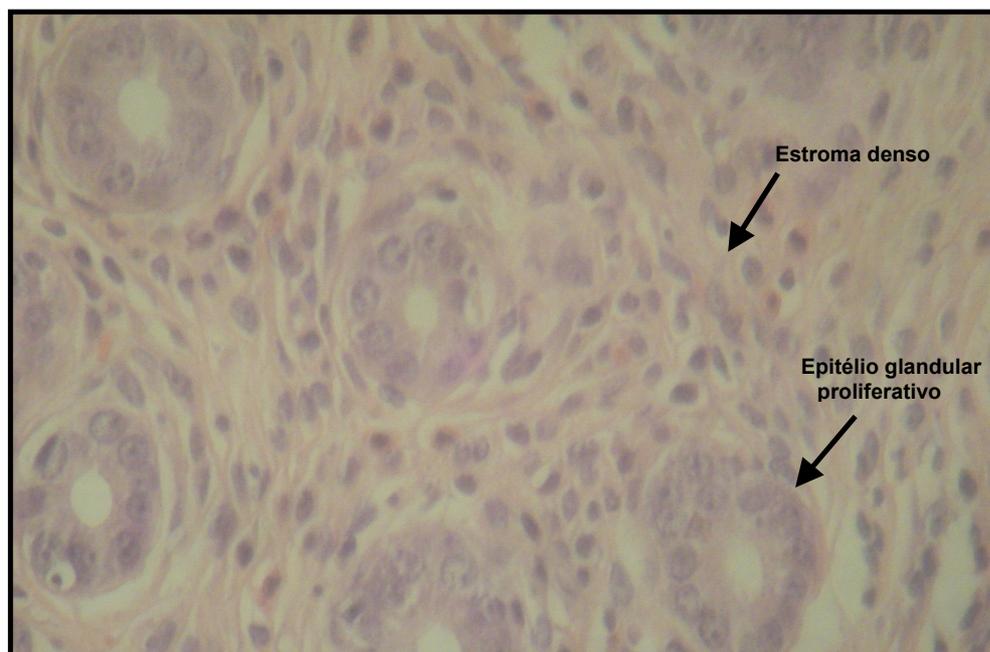


Figura 7 – Fotomicrografia de corte histopatológico de endométrio de rata do grupo ISO (ooforectomizado e tratado com isoflavonas de soja, 10mg/Kg, v.o, durante 24 semanas). Semelhante ao grupo FO, o epitélio glandular se apresenta proliferativo e com estroma denso. Aumento de 40x em coloração HE.



Figura 8 - Fotomicrografia de corte histopatológico de endométrio de animal do grupo EP (ooforectomizado e tratado com estroprogestativo, 0,5 mg/Kg, v.o, durante 24 semanas) Observar áreas com hiperplasia e metaplasia escamosa. Aumento de 40x em coloração HE.

7. DISCUSSÃO

A soja e suas isoflavonas isoladas têm sido extensivamente indicadas com o objetivo de prevenir ou amenizar os sintomas relacionados ao climatério. Muito tem se investigado a fim de confirmar seus benefícios, por meio de métodos científicos padronizados (BONILLA, 2004). Entretanto, apesar das investigações, ainda não existem estudos conclusivos sobre os efeitos benéficos das isoflavonas, em comparação à terapia estro-progestativa, que causa freqüentemente mastalgias, artralguas, tromboembolismo, aumento de peso, alteração do perfil lipídico, aumento do risco de neoplasias hormônio-dependentes, entre outros efeitos, nas pacientes que fazem o seu uso crônico (MOSQUETTE et al, 2005).

O ciclo estral, o qual possui as suas fases determinadas segundo a variação dos níveis dos hormônios ovarianos, estrogênio e progesterona, serve como um indicador da função reprodutiva em ratas.

Dessa forma, na análise do esfregaço vaginal a fase estro, na qual ocorre um aumento (pico) de estrogênio no organismo dos animais, é representada pela grande quantidade de células cornificadas, e a fase diestro, que ocorre quando há pouca quantidade de estrogênio no organismo, é representada pela ausência de células cornificadas, presença de células profundas e de abundantes leucócitos. As fases proestro e metaestro são fases intermediárias entre elas (MARCONDES et al, 2002).

Nesta pesquisa, do início até o final do sexto mês do tratamento, os animais do grupo isoflavonas (ISO) apresentaram-se com predominância na fase estro (88%), assim como o grupo estroprogestativo (EP), que se apresentou com 85% nesta mesma fase. Esses dados mostraram que as isoflavonas conseguem manter um nível de maturação celular semelhante aos estroprogestativos.

Um estudo realizado por Rimoldi et al (2007), que utilizaram animais Sprague- Dawley, alimentados de ração contendo genisteína nas doses de 5,4 mg/Kg e 54 mg/Kg, durante 3 meses, indicou que, na dose mais baixa, a genisteína não estimulou a maturação do epitélio vaginal. Entretanto, na dose de 54 mg/Kg provocou um aumento do número de camadas do epitélio vaginal, indicando que houve estímulo da maturação celular.

Baird et al (1995), observaram que uma dieta suplementada com 165 mg/dia (equivalente a 2,75mg/kg) de isoflavonas de soja, utilizada por um mês,

promoveu um pequeno estímulo na maturação do epitélio vaginal de mulheres pós-menopausadas. Entretanto, Duncan et al (1999), quando utilizou 2 mg/Kg de isoflavonas de soja presentes na dieta de mulheres pós-menopausadas, durante 3 meses, não observaram alterações na citologia vaginal das pacientes.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho que evidenciaram uma maturação, com aumento do número de células cornificadas e a manutenção dessa estimulação, causadas por um tratamento de seis meses de duração, com a dose de 10 mg/Kg de isoflavonas de soja, confirmam achados da literatura de que esses fitoestrogênios são capazes de promover a maturação do epitélio vaginal, à semelhança do promovido por terapia estroprogestativa.

Em relação aos efeitos das isoflavonas de soja sobre o tecido mamário, após os seis meses de tratamento, as ratas apresentaram um típico epitélio atrófico, com atrofia ductal acentuada e fibrose peritubular, que foram características histológicas semelhantes às encontradas nos tecidos dos animais do grupo ooforectomizado não tratado.

Wood et al (2006), avaliaram o efeito 8,6 mg/ Kg de isoflavonas nas glândulas mamárias de macacas ooforectomizadas após um mês de tratamento e, não observaram nenhum sinal de trofismo mamário nos animais tratados.

Em ratas Wistar ooforectomizadas, Mosquette et al (2005) não observaram alterações no número e volume dos alvéolos mamários, quando os animais foram submetidos a uma dose diária de 100 mg/Kg de isoflavonas de soja, por dois meses. Rimoldi et al (2007) também não evidenciaram estimulação mamária quando utilizaram uma dieta enriquecida com genisteína, nas doses de 5,4 mg/Kg e 54 mg/Kg, relatando apenas uma incipiente formação luminal e ausência de secreção, características que também foram observadas nos animais que receberam a dieta controle.

Nesta pesquisa, diferentemente do observado no grupo ISO, nas ratas tratadas com estroprogestativo, na dose de 0,5 mg/kg foram observados sinais de estimulação mamária com presença de metaplasia apócrina, ectasia ductal com secreção focal.

Da mesma forma, Santos et al (2001), demonstraram que estrógenos equínos conjugados, na dose de 0,05mg/dia, promoveram hiperplasia acinar secretora em ratas ooforectomizadas, tratadas por trinta dias. Vicelli et al (2006) observaram que em ratas castradas tratadas com benzoato de estradiol

(5,37mg/rata/dia) ocorreu desenvolvimento de alterações histológicas como hiperplasia moderada e atipias epiteliais, em um tratamento de dez semanas.

Conforme demonstrado pelo presente estudo, o tratamento crônico com isoflavonas de soja, na dose de 10 mg/Kg, sugere que o uso de longa duração não é capaz de induzir alterações proliferativas sobre a mama de ratas ooforectomizadas.

Quanto à determinação do peso úmido do útero, que é um órgão cuja estimulação é dependente de hormônios ovarianos, este trabalho demonstrou que as isoflavonas de soja em tratamento prolongado, não foi capaz de induzir o aumento do útero, que permaneceu com peso semelhante aos órgãos atrofiados em decorrência da ooforectomia (grupo OOF), cuja redução foi 86%, em relação aos animais falso operados.

Bahr et al (2005), observaram que o peso uterino de ratas Sprague-Dawley ooforectomizadas e submetidas à dieta com ração enriquecida com soja, durante 3 meses, apresentou-se reduzido em comparação aos das ratas intactas alimentadas com dieta sem soja.

Outro estudo, realizado por Nakai et al, (2005), que também avaliaram o peso úmido do útero de ratas Sprague- Dawley expostas a uma dieta contendo isoflavonas em duas concentrações, 17,2 g/Kg e 34,4 g/Kg de ração, durante 3 meses, não observaram nenhum efeito sobre o peso uterino.

Porém, a influência das isoflavonas em estimular o desenvolvimento uterino pode estar relacionada com a dose administrada. Rimoldi et al, (2007), verificaram que a genisteína, na dose de 5,4 mg/Kg utilizadas durante 3 meses, não provocou alteração no peso uterino quando comparado aos valores de animais ooforectomizados. Entretanto, na dose de 54 mg/Kg promoveu um aumento do peso úmido do útero, cerca de duas vezes em relação ao grupo controle. Esse aumento, entretanto, não foi suficiente para se igualar com os valores de peso uterino de ratas com ovários intactos. Já, Mosquette et al., (2006) observaram um aumento de duas vezes do peso uterino na dose de 300mg/kg de isoflavonas de soja, quando comparado aos valores de animais ooforectomizados que receberam apenas o veículo, durante 21 dias de tratamento. Contudo, observaram que na dose mais baixa (10 mg/Kg) de isoflavonas não houve alteração no peso desse órgão.

As isoflavonas de soja na dose de 157 mg/Kg também estimularam o peso uterino quando foram utilizadas por um mês, (YAMAGUCHI et al, 2001). As ratas tratadas com isoflavonas apresentaram valores de peso úmido do útero

maiores do que as ratas sem ovários, porém não tratadas, com uma tendência a se aproximar dos valores de peso uterino de ratas que permaneceram com ovários intactos ou que fizeram uso de uma terapia estrogênica.

Estes estudos mostram, portanto, que a capacidade de estimular o aumento do peso uterino está diretamente relacionada com a dose de isoflavonas utilizada. Portanto, a dose utilizada em nossos experimentos estimulou a maturação do epitélio vaginal sem, entretanto, aumentar o peso uterino.

Quando analisado o efeito do estroprogestativo sobre o peso úmido do útero, foi observado que a terapia estroprogestativa, utilizada na dose de 0,5 mg/Kg por um período de seis meses, promoveu um aumento de 52% do peso uterino quando comparado aos animais ooforectomizados não tratados.

De modo semelhante, Rimoldi et al 2007, observaram um aumento de cinco vezes o valor desse órgão, em ratas alimentadas com ração contendo 0,7 mg/Kg de estradiol em comparação ao grupo controle ooforectomizado, após três meses de tratamento.

Mosquette et al, 2006, também verificaram que o efeito dos estrogênios conjugados eqüinos (200 mg/Kg) ocasionou uma elevação cerca de duas vezes o valor do peso do útero em relação aos animais ooforectomizados tratados por 21 dias. Portanto, esses dados demonstram que a terapia com estrogênio conjugado é capaz de estimular o desenvolvimento do peso uterino, quando utilizado em um tratamento prolongado.

Para confirmar os efeitos das isoflavonas sobre o desenvolvimento do útero, foi realizada a análise histológica do endométrio dos animais. A análise desses órgãos demonstraram que o tratamento de 24 semanas com 10 mg/Kg de isoflavonas de soja, não alteraram a morfologia endometrial se comparada ao tecido do animal operação simulada (OS) que apresentaram ovários intactos. Em ambos os grupos o epitélio apresentou-se dentro da normalidade, proliferativo e com estroma denso.

Mosquette et al, (2005), também observaram as mesmas características endometriais quando utilizaram a genisteína na dose de 10 mg/Kg, durante 21 dias.

Entretanto, as isoflavonas de soja, promoveram o aparecimento de metaplasia glandular, no endométrio, em uma pequena quantidade de animais que consumiram ração contendo isoflavonas na concentração de 34,4 g/Kg durante 3 meses (NAKAI et al, 2005).

Estudos clínicos também relatam um pequeno efeito proliferativo das isoflavonas sobre o epitélio endometrial, como demonstrado por Unfer et al (2004), que avaliaram o efeito de 150 mg diários de isoflavonas sobre a morfologia uterina de 179 mulheres pós-menopausadas, durante 5 anos. Este estudo mostrou que somente 2,7% das pacientes apresentaram endométrio proliferativo e, 3,3% com hiperplasia endometrial.

O estudo realizado por Wolff et al (2006), que avaliou o tratamento de 6 meses, com 80mg/dia de isoflavonas de soja em 32 mulheres menopausadas, observou que 15,6% desenvolveram proliferação endometrial e 3,1% apresentaram hiperplasia simples.

Da mesma forma do que ocorreu com o tecido mamário, a utilização de estroprogestativos, (0,5 mg/Kg) promoveu o desenvolvimento de alterações significativas no epitélio endometrial dos animais do grupo EP. Foi observada hiperplasia glandular e metaplasia escamosa. Esses achados em nossa pesquisa foram semelhantes aos obtidos por Rimoldi et al (2007), que observaram em ratas ooforectomizadas e tratadas com estradiol (0,7mg/kg), hiperplasia, hipertrofia e metaplasia escamosa uterina, após três meses de tratamento hormonal. Murray et al (2003), também observaram hiperplasia endometrial em mulheres pós-menopausadas que receberam estradiol (0,5 mg/Kg) em um período de seis meses.

Apesar do emprego diferentes doses e tempos de tratamento, os estudos clínicos e pré-clínicos corroboram com os resultados encontrados pela presente pesquisa, demonstrando mínima relação entre o uso de isoflavonas de soja com alterações endometriais.

Em relação à evolução ponderal durante as 24 semanas, as ratas ooforectomizadas apresentaram um aumento de peso corporal quando comparadas com o grupo operação simulada (OS). Essa elevação, que apresentou o valor máximo de 16% na quinta semana de tratamento, demonstrou que a deficiência dos hormônios ovarianos está relacionada com um maior desenvolvimento ponderal dos animais. Este aumento de peso, porém, não esteve relacionado à estimulação no consumo de alimento, pois, não houve alteração na ingestão alimentar dos animais castrados.

Vasconcellos et al (2004) também observaram que os animais submetidos a ooforectomia bilateral apresentaram valores de peso corporal 10%

maiores que os de ratas que possuíam os seus ovários íntegros, confirmando a influência dos hormônios sexuais sobre o valor ponderal.

Entretanto, neste estudo, quando as ratas ooforectomizadas foram tratadas com isoflavonas de soja ou estroprogestativo o peso corporal foi reduzido.

Rimoldi et al (2007), analisando o peso corporal de ratas Sprague-Dawley submetidas a um consumo de ração com genisteína na dose de 54 mg/Kg, por um período de 3 meses, observaram que a genisteína promoveu uma diminuição de 14% no peso corporal . Da mesma forma Kim et al (2005) observaram que a genisteína, quando administrada juntamente com uma dieta rica em gordura a camundongos, foi capaz de manter o peso corporal desses roedores equivalentes aos pesos dos animais alimentados com uma dieta pobre em gordura.

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa, os efeitos das isoflavonas observados após um a terapia diária por seis meses, longo prazo, nos parâmetros avaliados, nos permite sugerir que a dose empregada (10 mg/kg) por via oral, é eficaz e segura, promovendo a maturação do epitélio vaginal, estimulando de forma discreta o epitélio uterino, porém não alterando o epitélio mamário.

Além disso, ao confrontar os dados obtidos com a isoflavonas, a terapia estroprogestativa diária crônica, na dose usual encontrada na literatura (0,5 mg/kg) promoveu a estimulação mamária e endometrial em grau elevado, o que pode favorecer o aparecimento de importantes seqüelas para seus usuários (RIMOLDI et al,2007).

Outras avaliações como, na função vasomotora e cardíaca, além da determinação da concentração sérica de lipídios e outros analitos e a histopatologia de glândulas endócrinas estão sendo realizados para determinar os efeitos das isoflavonas de soja e do estroprogestativo na terapia diária de longo prazo.

8. CONCLUSÕES

O uso prolongado das isoflavonas de soja foi capaz de reestabelecer a maturação do epitélio vaginal de ratas ooforectomizadas, à semelhança da terapia estroprogestativa;

As isoflavonas de soja normalizaram parcialmente o peso corporal de ratas com hipoestrogenismo.

A terapia com isoflavonas de soja mantém a atrofia do epitélio mamário causada pela ooforectomia.

As isoflavonas de soja mantêm os valores de peso uterino reduzidos, semelhantes aos efeitos causados pela ooforectomia.

O uso crônico das isoflavonas de soja estimulou, de forma discreta, a proliferação das células endometriais.

REFERÊNCIAS

ATKINSON, C. & BINGHAM, S. A. Mammographic breast density as a biomarker of effects of isoflavones on the female breast. **Breast Cancer Res.** v. 4, n. 1, p. 1–4, 2002.

BAHR, J. 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 Journal.** v.12, n. 2, p. 165-173, 2005.

BAIRD D. D. et al. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**v. 80, p. 1685- 1690, 1995.

BEDANI, R. & ROSSI, E. A. Isoflavonas: Bioquímica, Fisiologia, e implicações para saúde. **B. CEPPA.** v. 23, n. 2, p 231-264, 2005.

BLAND,K. I. & COPELAND,E. M. **A Mama, Tratamento Compreensivo das Doenças Benignas e Malignas.** 3 ed. São Paulo: Manole, 1994.

BONILLA, C. A. Isoflavonas em ginecología, terapia no convencional. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.** v. 55, p 209-217, 2004.

CICINELLI, E., et al. Twice-weekly transdermal estradiol and vaginal progesterone as continuous combined hormone replacement therapy in postmenopausal women: A 1-year prospective study. **Am J Obstet Gynecol.** v.187, p 556-60, 2002.

CLARKSON,T.B., ANTHONY,M.S., MORGAN,T.M. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparasion of the effects on conjugated equine estrogens ans soy phytoestrogens. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 86, p. 41-47, 2001.

CONCEIÇÃO, A. P. M., et al. Análise Histológica da Endometriose em Ratas Durante a Fase de Ciclo Estral. **Arq. Inst. Biol.** v. 72, n. 4, p. 439-443, 2005.

CORNWELL, T. et al. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochemistry.** v. 65, n. 8, p. 995-1016, 2004.

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,** v. 777, p. 191–202, 2002.

DUNCAN et al. Modest Hormonal Effects Of Soy Isoflavones in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** V. 84. N. 10, P. 3479-3484, 1999.

FEITOZA, S. **Avaliação das células de defesa do conteúdo vaginal de mulheres co e sem vulvovaginites.** 2003. 94 f. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) –

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GARCIA-PÉREZ, M. A., et al. Comparative effects of estradiol, raloxifene, and genistein on the uterus of ovariectomized mice. **Fertility and sterility**. v. 86 n. 4, 2006.

GUYTON & HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

HE, J. et al. Effect of Soybean Protein on Blood Pressure: A Randomized, Controlled Trial. **Annals of Internal Medicine**. v. 143, p. 1-9, 2005.

HUTCHINS, A. M. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. **Nutri Cancer**. v. 39, n. 1, p. 58-65, 2001.

JUNQUEIRA, J.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004.

KEEP; P. A. V.; LAURITZEN. C. **Envelhecimento e Estrogênios**. 1. ed. São Paulo: Medisa. 184p, 1975.

KHALIL,R.A. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. **Hypertension**. v. 46, n. 2, p. 249-254, 2005.

KIM, S. et al. Hepatic genes expression profiles are altered by genistein supplementation in mice with diet-induced obesity. **The Journal of Nutrition**. v. 135, p 33-41, 2005.

LONG, J. A. & EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**. v. 6, p. 1-148, 1922.

MAJANDANATHA, M. et al. Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats. **Carcinogenesis**. v. 27, n. 10, p. 1970-1979, 2006.

MANSON, J. E. et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. **The New England Journal of Medicine**.v. 349 n. 6, p. 523-534, 2003.

MARCONDES, F.K. et al. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**. v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MASKARINEC, G. et al. A 2-Year Soy Intervention in Premenopausal Women Does Not Change Mammographic Densities. **Journal of Nutrition**. v. 134, p. 3089-3094, 2004.

MASSON, P. Tumeurs humaines. Histologie. **Diagnostics et techniques**. 2. Ed. Paris, Librairie Maloine, p. 1061-1048, 1956.

McCANN, S. E. et al. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, Phytochemicals and Food Groups. **Journal of Nutrition**. v.133, p.1937–1942, 2003.

McGARVEY C. et al. Phytoestrogens and Gonadotropin- Releasing Hormone Pulse Generator Activity and Pituitary Luteinizing Hormone Release in the rat. **Endocrinology**. v. 142, n. 3, p 1202-1208, 2001.

MONTALBÁN, E. B. Interés terapéutico de los fitoestrógenos en ginecología. Disponível em: <[http:// www.medicinanaturista.net](http://www.medicinanaturista.net)>. Acesso em: 20 ago. (2004),

MOORE, K. L. & DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MORAES, A. V. S. , et al. Efeitos da terapia estro-raloxifeno sobre o endométrio de ratas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.28, n. 2, p. 101-106, 2006.

MOSQUETTE, R. et al. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas com isoflavona ou estrogênios. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.27, n. 4, p. 204-209, 2005.

MOSQUETTE, R. et al. Efeitos das isoflavonas sobre o miométrio de ratas adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 28, n. 4, p. 227-231, 2006.

MURRAY, M. J. et al. Soy protein isolate with isoflavones does not prevent estradiol-induced endometrial hyperplasia in postmenopausal women: a pilot trial. **Menopause**. v. 10, n. 5, p. 456-464, 2003.

NAHÁS, E. A. P. et al. Efeitos da Isoflavona sobre os sintomas Climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 337-343, 2003.

NAKAI, M. et al . Dietary soy protein and isoflavones have no significant effect on bone and a potentially negative effect on the uterus of sexually mature intact Sprague-Dawley female rats. **Menopause** .v. 12, n. 3, p. 291-298, 2005.

NIKANDER, E. Lack of effect of isoflavonoids on the vagina and endometrium in postmenopausal women. **Fertility and Sterility**. v. 83, n. 1, p. 137-142, 2005.

PANTALEÃO, J. A. S., et al. Efeito da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 31, n. 3, p. 124-130, 2009.

PELUSO, M. R. Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. **Exp Biol Med**. v. 231, p. 1287-1299, 2006.

PÉREZ-RIVERO, J. et al. Los fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. **AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE)**. v. 67, n. 3, p. 325-331, 2007.

PIETINEN, P. et al. Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in Eastern Finland. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 10, p. 339-344, 2001.

PIOVESAN, A. C., et al. Efeito morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 27, n. 4, p. 204-209, 2005.

RIMOLDI, G. et al. Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. **Environmental Health Perspectives**. v. 115, n. 1, p. 62-68, 2007.

ROBBINS, S. L. et al. **Basic Pathology**. 6.ed. .Rio de Janeiro: Elsevier. 608p, 2005.

SACKS, F. M. et al. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. **Circulation**. v.113, p. 1034-1044, 2006.

SANTOS, L. O. M. et al. Effect of Conjugated Estrogens and of Medroxyprogesterone on Breast Tissue: an Experimental Study . **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 23, n. 08, p. 507-513, 2001.

SHIDA, J.Y. et al. Morphological and Morphometrical Study of Permanent Estrus Rat Mammary Gland Treated with Danazol. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.23, n. 01, p. 41-45, 2001.

SILVA , B. B. da et al. Efeitos do Tamoxifeno e dos Estrogênios Conjugados no Epitélio Mamário de Ratas em Estro Permanente. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 22, n 1, p. 33-36, 2000.

SOKAL, R. R. & ROHLF, J.F. **Biometry: The Principle and Practice of Statistics in Biological Research**. New York, W. H. Freeman and CO, 776p, 1969.

STAUFFER, B. L. et al. Soy diet worsens heart disease in mice. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, n. 1, p. 209-216, 2006.

STEPHEN, S. S. **Histology for Pathologists**. 2.ed. Philadelphia: Nova York, 1200p, 1997.

TOLOSA, H. **A menopausa**. São Paulo: Ed.Contexto, 63p, 1998.

TORTORA, G. S.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1047p, 2002.

UNFER, V. et al. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Fertility and Sterility**. v. 82, n. 1, p. 145-148, 2004.

VASCONCELLOS, L. S. et al. Influência da Ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. **Arq. Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 2, p. 299-304, 2004.

VICELLI, J. T. et al. Histologia mamária após uso de esteróides sexuais- estudo em ratas. **Rev.Assoc.Med.Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 369-374, 2006.

VIEIRA L. H. L., et al. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados eqüinos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 239, n. 5, p. 248-253, 2007.

WOLFF, L. P. G. et al. Avaliação do endométrio em menopausadas após uso de isoflavonas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 52, n. 6, p. 419-423, 2006.

WOOD C. E. et al. Breast and Uterine Effects of Soy Isoflavones and Conjugated Equine Estrogens in Postmenopausal Female Monkeys. **The Journal of Clinical & Endocrinology Metabolism**. v. 89, n. 7, p. 3462-3468, 2006.

YAMAGUCHI, K. et al. Effects of Phytoestrogens on Acetylcholine- and Isoprenaline-Induced Vasodilation in Rat Aorta. Japanese. **Journal of Pharmacology**. v. 87, p. 67-73, 2001.

YANG, G. et al. Longitudinal study of soy soy food intake and blood pressure among middle- aged and elderly Chinese women. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 81, n. 5, p. 1012-1017, 2005.

ANEXOS

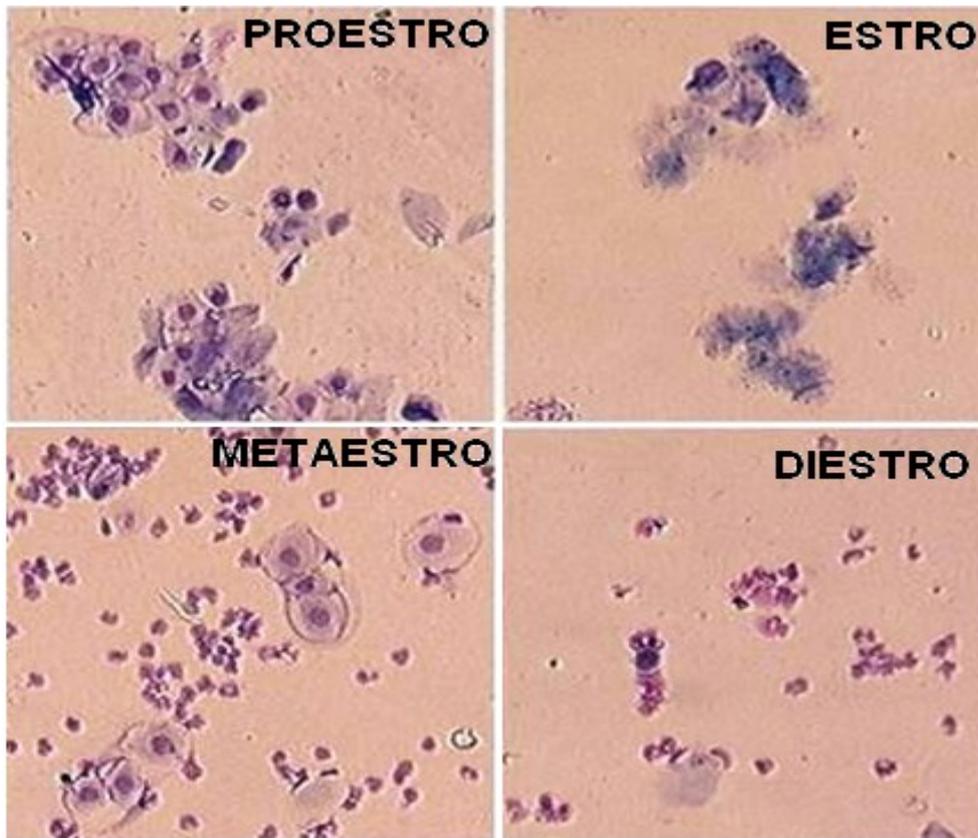


Fig - 09 - Fases do ciclo estral: Na fase proestro o esfregaço vaginal consiste predominantemente células epiteliais nucleadas. A fase estro é caracterizada pela presença de células anucleadas. Na fase metaestro o esfregaço apresenta uma proporção semelhante entre, células epiteliais nucleadas, células epiteliais anucleadas e leucócitos, já na fase diestro ocorre a predominância de numerosos leucócitos.

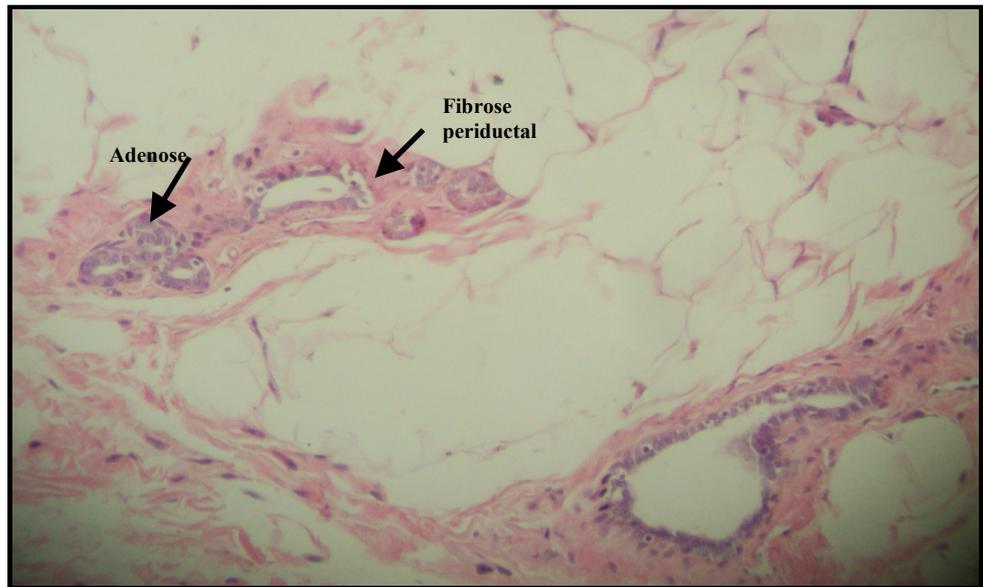


Figura 10 – Fotomicrografia do tecido mamário de rata do grupo falso operado (FO). Presença de fibrose periductal, adenose e vacúolo com material amorfo. Aumento de 10X em coloração HE.

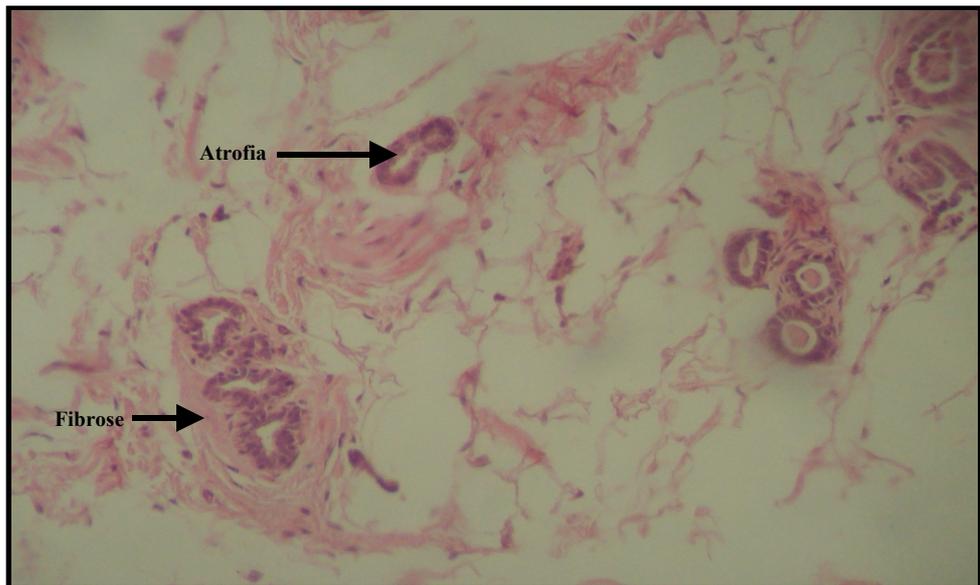


Figura 11 – Fotomicrografia do tecido mamário de rata do grupo ooforectomizado. Presença de fibrose e atrofia. Aumento de 10X em coloração HE.

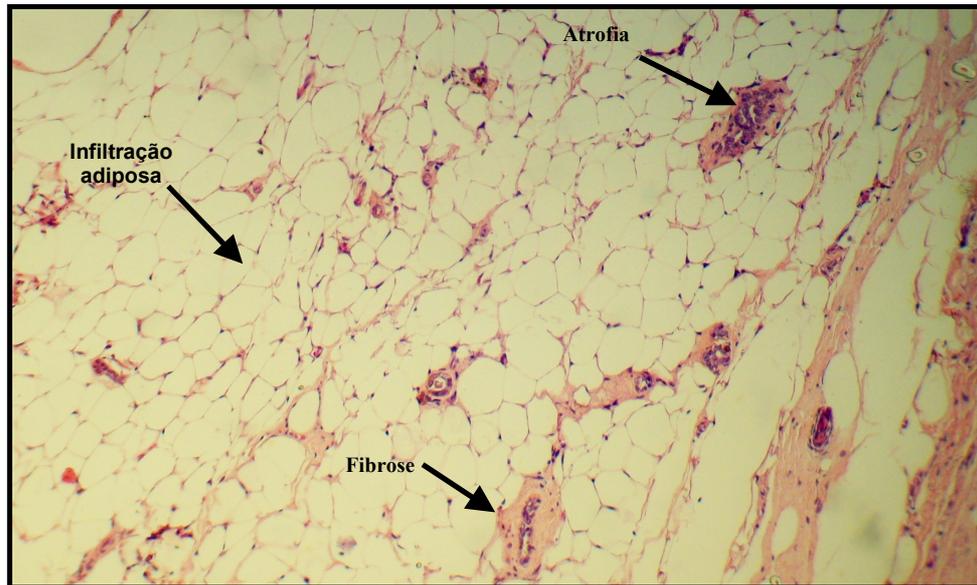


Figura 12 – Fotomicrografia do tecido mamário de rata do grupo ISO (ooforectomizados e tratados com isoflavonas de soja, 10mg/kg, v.o., durante 24 semanas). Presença de atrofia ductal, fibrose peritubular e infiltração adiposa. Aumento de 10X em coloração HE



Figura 13 – Fotomicrografia do tecido mamário de rata do grupo EP (ooforectomizados e tratados durante 24 semanas, v.o., com estrogênios conjugados 0,5 mg/kg). Presença de metaplasia apócrina, ectasia ductal com secreção. Aumento de 10X em coloração HE.

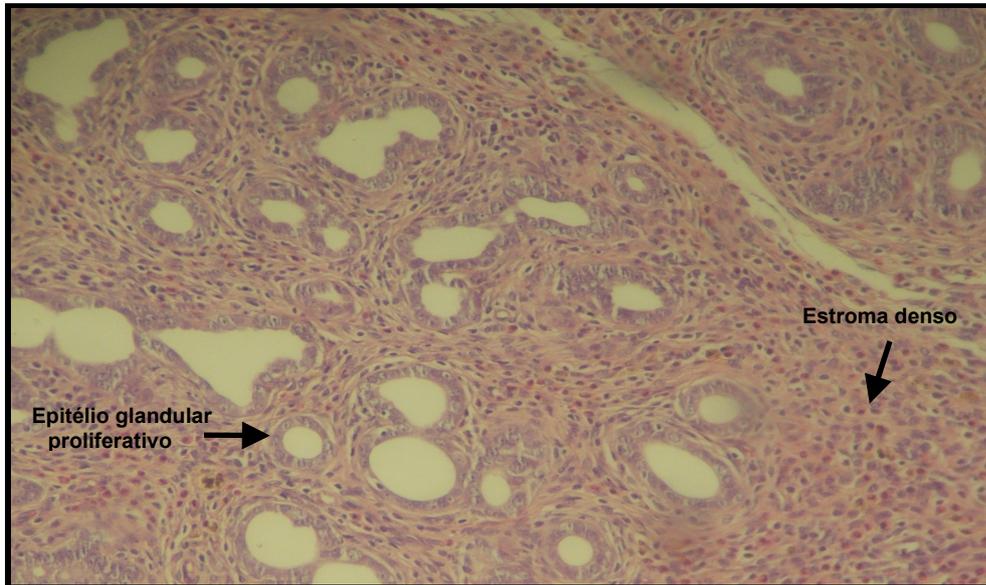


Figura 14 - Fotomicrografia de corte histopatológico de endométrio de rata do grupo operação simulada (OS), após 24 semanas de tratamento. Visualizar o epitélio glandular proliferativo com estroma denso. Aumento de 10x em coloração HE

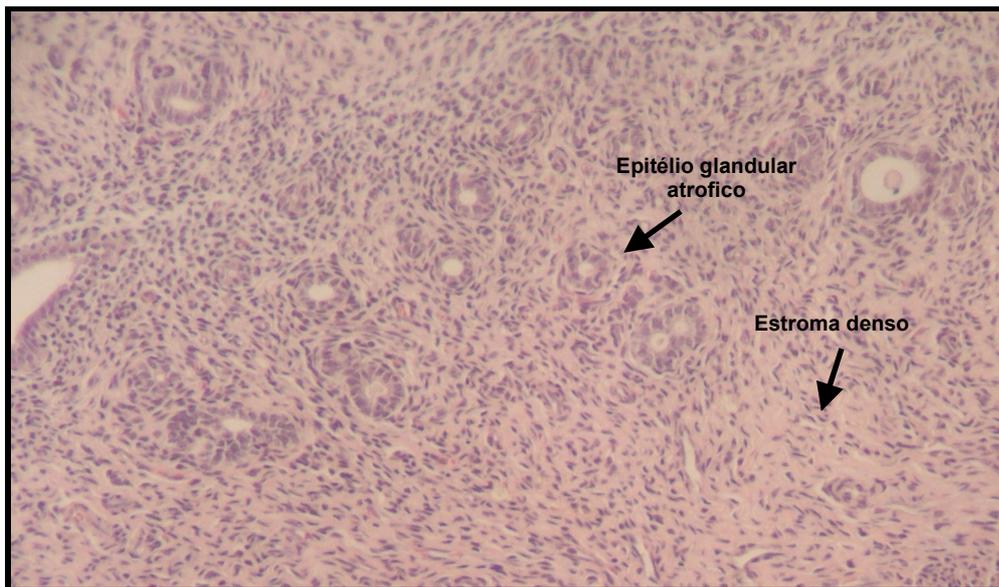


Figura 15 - Fotomicrografia de corte histopatológico de endométrio de rata do grupo ooforectomizado (OOF) não tratado, após 24 semanas. Observar glândulas de tamanho pequeno com células cúbicas simples e estroma denso. Aumento de 10x em coloração HE.

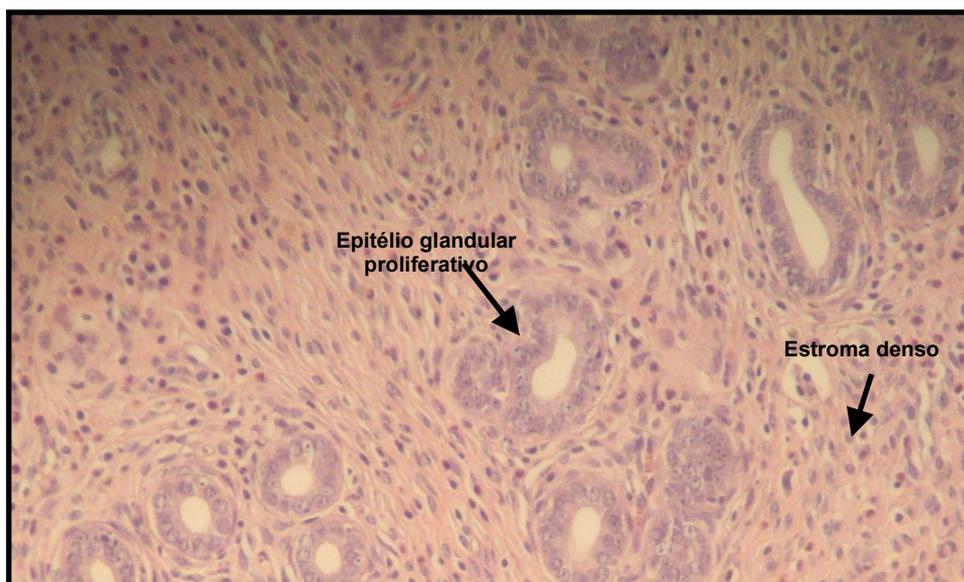


Figura 16 – Fotomicrografia de corte histopatológico de endométrio de rata do grupo ISO (ooforectomizado e tratado com isoflavonas de soja, 10mg/Kg, v.o, durante 24 semanas). Semelhante ao grupo OS, o epitélio glandular se apresenta proliferativo e com estroma denso. Aumento de 10x em coloração HE.

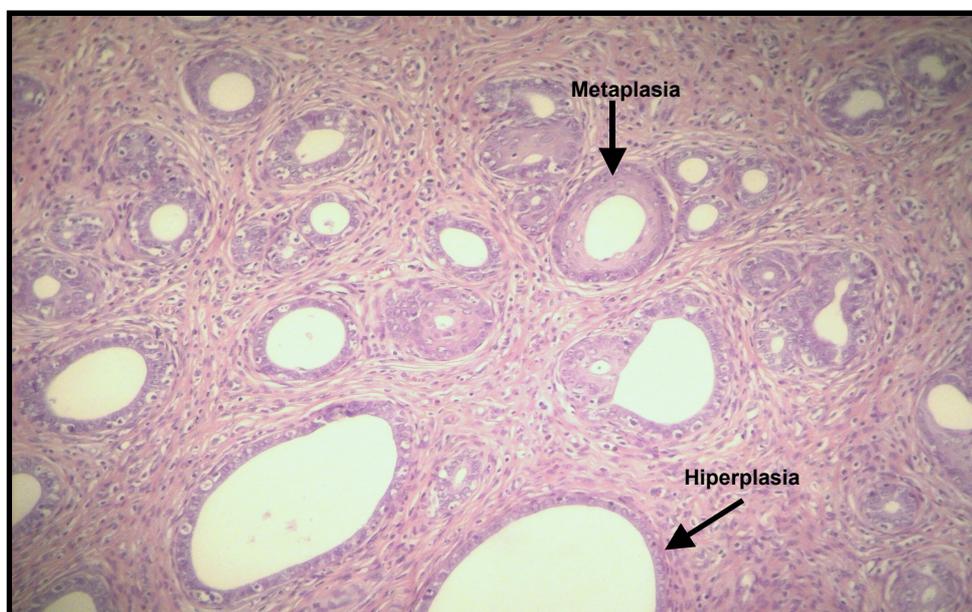


Figura 17 - Fotomicrografia de corte histopatológico de endométrio de animal do grupo EP (ooforectomizado e tratado com estroprogestativo, 0,5 mg/Kg, v.o, durante 24 semanas). Observar áreas com hiperplasia e metaplasia escamosa. Aumento de 10x em coloração HE.

