

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INTERCEPTIVO DA IPRIFLAVONA EM RATAS WISTAR

EVALUATION OF THE POTENTIAL OF INTERCEPTIVE IPRIFLAVONE IN WISTAR RATS

Eduardo Siqueira Fernandes*, Tatianna Rosa dos Santos**, Tânia Toledo de Oliveira***, Martha de Oliveira Guerra****, Vera Maria Peters#, Amaury Teixeira Leite Andrade##

RESUMO

A ipriflavona possui efeito inibitório sobre o citocromo p450 e sobre a proliferação do DNA, interferindo na síntese de hormônios esteroídianos, e consequente interferência no transporte e desenvolvimento pré-implantacional e na implantação do blastocisto. Consumidos em altas doses pode acarretar abortamentos e malformações. Para verificar a embriotoxicidade da ipriflavona durante as fases de transporte tubário e implantação do blastocisto de ratas, ratas Wistar prenhes foram tratadas duas vezes ao dia com 1 mL de suspensão aquosa de ipriflavona, nas doses de 0 (C), 300 (T1), 1500 (T2) e 3000 (T3) mg/kg/dose, durante os oito primeiros dias de prenhez com eutanásia no 14o dia. Índícios de toxicidade foram avaliados por análises hematimétricas, bioquímicas e comportamentais. Foram contados fetos vivos, mortos e reabsorvidos (inicial e tardiamente). Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade. Índice de implantação e perdas pré-embriônica sofreram interferência do uso da ipriflavona. Dados apontam para um efeito estrogênico da ipriflavona, observados na interferência da implantação do blastocisto de ratas Wistar.

PALAVRAS-CHAVE

Ipriflavona. Ratos Wistar. Embriogênese. Toxicidade.

ABSTRACT

Ipriflavone has inhibitory effect on the cytochrome p450 and the proliferation of DNA, interfering with hormone synthesis esteroídianos, and consequent interference with the transport and preimplantation development and implantation of the blastocyst. Consumed in high doses can cause miscarriages and malformations. To verify the embryotoxicity of ipriflavone during the phases of tubal transport and implantation of the blastocyst in rats, Wistar rats were treated twice daily with 1 mL of aqueous suspension of ipriflavone at doses of 0 (C), 300 (T1), 1500 (T2) and 3000 (T3) mg / kg / dose during the first eight days of pregnancy with euthanasia on day 14. Signs of toxicity were characterized by hematological, biochemical and behavioral. Live fetuses were counted, dead and resorbed (early and late). The animals showed no clinical signs of toxicity. Index pre-implantation embryo and losses suffered interference from the use of ipriflavone. Data point to an estrogenic effect of ipriflavone, due to interference in blastocyst implantation in Wistar rats.

KEYWORDS

Ipriflavone. Wistar Rats. Embryogenesis. Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm-se disseminado a idéia de que constituintes de plantas com uma estrutura fenólica similar aos estrogênios, conhecidos como fitoestrogênios (FE), seriam alternativas naturais à terapia de reposição hormonal da menopausa (TRHM). Conseqüentemente existe um movimento global incentivando o consumo de alimentos ricos em FE e de comprimidos de extratos concentrados de isoflavonas (CLAUPAUCH et al., 2002). A este constituinte é atribuído diversas ações, como por exemplo, anticarcinogênica, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (HARBONE et al., 2000; HAVSTEEN, 2002). A ipriflavona, um

Correspondence author: Eduardo Siqueira Fernandes. edusifer@yahoo.com.br.

Agradecimentos: O trabalho realizado foi financiado pela Rede Mineira de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Terapêuticos – FAPEMIG, Brasil.

* Médico Residente em Obstetrícia e Ginecologia do Hospital Júlia Kubitschek, FHEMIG, Belo Horizonte – MG. edusifer@yahoo.com.br.

** Mestre em Ciências Biológicas – Biologia e Comportamento Animal – Universidade Federal de Juiz de Fora.

*** Professora Associado III da Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

**** Professora convidada do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Professora Associado da Universidade Federal de Juiz de Fora. Diretora do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Professor convidado do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Received: 07/2010

Accepted: 09/2010

flavonóide com atividade estrogênica comprovada, se destaca em estudos recentes por seu potencial na prevenção da osteoporose visto através da inibição da reabsorção óssea (CHAMBO FILHO et al., 2000; HEAD, 1999; YAMAZAKI, 1986).

As isoflavonas incluem a genisteína, daidzeína, gliciteína, biochanina A e formononetina. Na maioria das plantas são encontradas na forma de glicosídeos (genistina e daidzina), isto é, ligadas a uma molécula de açúcar. No intestino, onde a genistina é metabolizada por ação de enzimas bacterianas, perde o resíduo de açúcar e transforma-se na forma mais ativa que é agliconada (genisteína). A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona) é um derivado sintético da isoflavona daidzeína e que apresenta estrutura química similar ao estradiol, assim, se une aos receptores de estrógenos, simulando seu efeito hormonal.

Utilizada por via oral, a ipriflavona é bem absorvida pelo intestino delgado, fígado, rins, pulmões e gordura e extensivamente metabolizada por oxidação no fígado, resultando em sete metabólitos diferentes (MOON et al., 2007). É excretada por via biliar, fecal e urinária e atinge nível sérico máximo em ratos em 1,5h possuindo meia-vida de 5,8h (LÉVAI et al., 1989; YOSHIDA et al., 1985). Em cães, o pico sérico é atingido em meia hora. A eliminação dos metabólitos ocorre em 48h em ratos e em 72h em cães (YOSHIDA et al., 1985).

A dose terapêutica diária recomendada da ipriflavona é de 600mg/kg/dia, comercializado sob a forma de cápsulas, nas concentrações de 200 e 300mg/kg/dose, sendo administrado, respectivamente, de oito em oito e de 12 em 12 horas (ANVISA, 2007).

A ipriflavona parece exercer seus efeitos protetores do osso pela inibição de osteoclastos e pelo aumento da atividade osteoblástica sem ter um efeito estrogênico direto (HEAD, 1999). Pequenas doses de ipriflavona demonstraram, *in vitro*, otimizar a proliferação de osteoblastos e inibir a atividade de osteoclastos maduros. Já altas doses de ipriflavona inibiram a proliferação de osteoblastos, indicando ser a ação da ipriflavona sobre as células osteoblásticas e osteoclásticas dose-dependente. GIOSSI et al. (1996) demonstraram que os metabólitos da ipriflavona são capazes de inibir a reabsorção óssea através da inibição da estimulação paratiroideana (GIOSSI et al., 1996).

A ipriflavona também seria um promissor agente contra a ação osteolítica da metástase tumoral óssea. Nesse caso a ipriflavona reduziria o número de osteoclastos no sítio do câncer ósseo. Embora os estudos sobre a ipriflavona se concentrem principalmente em seu efeito benéfico sobre o *turnover* ósseo, há relatos de sua eficácia no tratamento de tumores mamários. A ipriflavona atuaria suprimindo diretamente o crescimento de células cancerígenas mamárias modulando a expressão do gene estrogênio-dependente tumoral.

Dos mecanismos de ação da ipriflavona são mencionados, ainda, efeito inibitório sobre o citocromo p450 – vias CYP1A1/2,

2B1/2 e 2C11 – e inibição da proliferação do DNA, que poderiam interferir na síntese dos hormônios esteroideianos, por conseguinte, interferir no transporte e desenvolvimento pré-implantacional e na implantação do blastocisto (MOON et al., 2007).

O aumento da procura por fitoterápicos por mulheres em idade reprodutiva na prevenção ou tratamento de doenças, principalmente por produtos derivados da soja, evidencia a necessidade de se estabelecer a segurança desses produtos. Principalmente quanto à interferência na fisiologia da reprodução, uma vez que pode acarretar embriotoxicidade – por mutagenicidade e/ou genotoxicidade, principalmente se consumidos em altas doses – e levar a distúrbios como abortamentos e malformações. O objetivo desse estudo é, portanto, verificar a embriotoxicidade da ipriflavona durante as fases de transporte tubário e implantação do blastocisto de ratas.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 IPRIFLAVONA

A ipriflavona utilizada no experimento foi produzida na China, exportada pela empresa Nanjing Wellchem Enterprise CO., Ltd., importada pela empresa “Deg”, lote número 061005 (DCB: 03913.01-5; CAS: 35212-22-7; código: 1,1131-0; fração nº 534068 28/12/06; origem e procedência: China.

2.2 ANIMAIS

Foram usadas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) (N=60) com 180±15 g de peso, nulíparas e nuligestas, com três meses de idade, obtidas na colônia do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) – Universidade Federal de Juiz de Fora, onde são criadas em racks com ventilação e umidade controladas, em gaiolas providas de tampas com filtro milipore, localizados em salas com temperatura e luminosidade controladas.

Durante o experimento os animais foram alojados individualmente em microisoladores Alesco®, com temperatura de 22°, umidade relativa de 50-60% e 12h de ciclo claro/escuro. Os animais recebiam 25g de ração comercial Nuvilab® por dia e água *ad libitum*.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram acasalados no sistema poligâmico, com machos de fertilidade previamente comprovada, ao final da tarde (17:00h), na proporção de 3 fêmeas:1 macho. Na manhã seguinte, identificaram-se os animais inseminados pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, sendo este dia designado o dia 0 de gestação.

2.3.1 TRATAMENTO

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, cada grupo contendo 15 animais: Tratados I, II e III e Controle. Os grupos Tratados I, II e III receberam, respectivamente, via intragástrica, duas vezes ao dia (7:00h e 19:00h), 1mL de suspensão aquosa de ipriflavona, nas doses de 300, 1500 e 3000mg/kg/dose (dose terapêutica, 5 vezes e 10 vezes a dose indicada para uso humano), sendo estas doses calculadas diariamente para cada animal. As ratas do grupo Controle receberam, pela mesma via, 1mL de água destilada. Este procedimento foi realizado durante os oito primeiros dias de prenhez.

2.3.2 VARIÁVEIS MATERNAS

As ratas prenhes foram observadas diariamente para a avaliação de sinais clínicos de toxicidade materna (piloereção, hipo ou hipermotilidade no interior da gaiola, estereotípias, cromodaciorréia, diarreia, perdas sanguíneas vaginais e óbitos) (CHRISTIAN, 2001).

O consumo materno de ração também foi registrado durante toda a gestação. Para isso foram oferecidos a cada animal, diariamente, sempre no mesmo horário, 25g de ração. No dia seguinte estimou-se o consumo através da diferença de peso entre a sobra da ração encontrada em cada gaiola e o que foi colocado na véspera. A partir do oitavo dia de prenhez, os animais foram pesados a cada dois dias, até o décimo quarto dia.

A eutanásia foi realizada por exsanguinação total sob anestesia (90mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilazina, via intraperitoneal) no 14^o dia de prenhez. No sangue obtido foram determinados: hematimetria, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e índices hematimétricos volume globular médio (VGM), hemoglobina

globular média (HCM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM), utilizando-se de analisador automático de células hematológicas. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa, sendo que em cada extensão foram analisadas e contadas 100 células. Dosou-se também a concentração plasmática aspartato transaminase, alanina transaminase, uréia e creatinina.

Após laparotomia foram removidos ovários, tubas uterinas, fígado, rins, supra-renais, baço e timo. Os ovários foram pesados e neles contados, por meio de uma lupa de pala, os corpos lúteos. Os cornos uterinos foram removidos e neles foram contados fetos vivos, mortos e reabsorvidos (inicial e tardiamente), para determinação dos índices de implantação e taxas de reabsorção, além das perdas pré e pós-embriônica. Fetos e placentas foram pesados. Fígado, rim e supra-renal esquerdos, baço e timo foram fixados em formal a 10% para posterior processamento histopatológico.

Fetos foram observados por meio de uma lupa de pala para análise da morfologia externa e, assim, verificação de presença ou não de malformações congênicas.

2.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados com o auxílio do software "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS) 13.0. Os dados obtidos foram analisados através do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Para dados não homocedásticos e sem distribuição normal, foi usado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. Proporções foram analisadas pelo Chi-square. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

A metodologia foi anteriormente aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo nº 38/2003 – CEA).

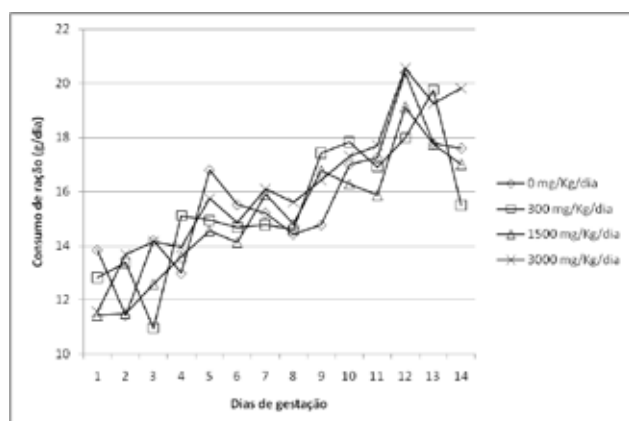


Gráfico 1: Consumo de ração pelas ratas Wistar prenhes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações 0, 300 mg/Kg/dia, 1500 mg/Kg/dia e 3000 mg/Kg/dia. Os resultados mostram o consumo médio diário do 1º ao 14º dia de gestação. P>0,05.

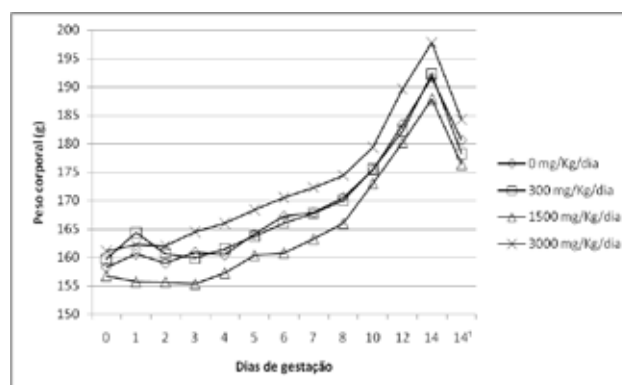


Gráfico 2: Peso corporal materno de ratas Wistar prenhes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações 0, 300 mg/Kg/dia, 1500 mg/Kg/dia e 3000 mg/Kg/dia. 14º dia: peso corporal materno após a retirada do trato reprodutivo. P>0,05.

Tabela 1: Variáveis da toxicidade materna em ratas Wistar após o tratamento com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações 0, 300mg/Kg/dia, 1500 mg/Kg/dia e 3000mg/Kg/dia, nos oito primeiros dias de prenhez.

Variáveis maternas	Grupos experimentais			
	Controle (12)	TI (13)	TII (13)	TIII (12)
Ganho de peso corporal (g) Dias 0-15	22,42 ± 7,77	18,51 ± 5,76	19,53 ± 5,85	23,13 ± 7,20
Fígado: peso absoluto (g)	8,04 ± 0,17	7,49 ± 0,96	7,51 ± 0,68	7,91 ± 0,51
Peso relativo (g)	4,45 ± 0,28	4,19 ± 0,30	4,26 ± 0,25	4,30 ± 0,29
Rins: peso absoluto (mg)	1320 ± 92,3	1354 ± 172,7	1365 ± 133,5	1377 ± 101,1
Peso relativo	731,61 ± 37,4	757,81 ± 52,2	773,77 ± 40,8	747,8 ± 43,3
Supra-renais: peso absoluto	57,58 ± 5,5	60,84 ± 8,2	57,53 ± 6,2	59,81 ± 6,3
Peso relativo	31,90 ± 2,6	34,09 ± 3,4	32,87 ± 2,2	32,52 ± 2,1
Peso baço (mg)	484,91 ± 55,9	464,46 ± 55,43	472,15 ± 59,6	498,33 ± 70,8
Peso relativo	268,28 ± 23,0	260,05 ± 16,7	267,50 ± 24,6	270,02 ± 32,8
Peso ovários (mg)	58,5 ± 6,4	59,15 ± 7,98	55,07 ± 6,39	58,16 ± 8,49
Nº de corpos lúteos	10,3 ± 1,3	11,4 ± 1,2	11,3 ± 1,6	11,7 ± 1,2
Implantes (%)	96,8	85,9 *	82,3*	89,1*
Perdas pré-implantação (%)	3,2	14,1*	17,7*	10,9*
Perdas pós implantação (%)	2,5	5,7	6,0	6,9

Tabela 2: Variáveis fetais após o tratamento com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações 0, 300mg/Kg/dia, 1500 mg/Kg/dia e 3000mg/Kg/dia, nos oito primeiros dias de prenhez.

Variáveis fetais	Grupos experimentais			
	Controle	TI	TII	TIII
Fetos vivos	9,66 ± 1,30	9,30 ± 2,75	9,00 ± 3,59	9,38 ± 2,53
Fetos mortos (%)				
Peso fetos/ninhada (g)	1,79 ± 0,26	1,76 ± 0,64	1,75 ± 0,49	1,78 ± 0,68
Peso placenta/ninhada (g)	1,52 ± 0,18	1,44 ± 0,32	1,43 ± 0,37	1,38 ± 0,50

Tabela 3: VGM: volume globular médio; HGM: hemoglobina globular média; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global; ALT: alanino aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

Variáveis hematológicas e bioquímicas	Grupos experimentais			
	Controle	TI	TII	TIII
Hematimetria (x10 ³)	61,22 ± 3,77	63,16 ± 4,50	59,39 ± 4,02	63,66 ± 5,53
Hematócrito	37,15 ± 2,97	37,85 ± 3,82	36,05 ± 2,19	37,54 ± 3,22
VGM	61,25 ± 2,77	60,25 ± 3,44	60,92 ± 4,35	57,18 ± 2,90
HGM	19,08 ± 0,79	19,00 ± 0,85	19,76 ± 1,79	18,27 ± 2,15
CHGM	31,41 ± 1,88	31,58 ± 1,88	32,38 ± 2,14	31,64 ± 2,38
Hemoglobina	11,65 ± 0,66	11,89 ± 0,61	11,61 ± 0,67	11,90 ± 0,76
LG (x10 ³)	5,73 ± 1,07	6,28 ± 1,96	6,00 ± 1,34	5,53 ± 0,96
Linfócitos	64,60 ± 4,90	62,10 ± 5,30	59,60 ± 10,6	65,20 ± 7,20
Neut. Segmentados	32,10 ± 4,30	35,10 ± 3,80	33,10 ± 6,70	29,80 ± 4,70
ALT (U/L)	58,10 ± 2,40	54,70 ± 2,00	51,80 ± 1,10	76,60 ± 5,60
AST (U/L)	25,60 ± 7,30	28,60 ± 7,50	27,20 ± 7,30	34,80 ± 11,80
Uréia (mg/dL)	63,50 ± 11,10	56,40 ± 7,70	58,70 ± 11,60	58,10 ± 6,60
Creatinina (mg/dL)	0,52 ± 0,01	0,53 ± 0,09	0,55 ± 0,08	0,53 ± 0,15

3 RESULTADOS

Entre as 60 ratas utilizadas no experimento, dez (16,66%) não estavam prenhes no momento da autópsia: três (4,99%) do grupo controle, duas (3,33%) do grupo tratado I, duas (3,33%) do grupo tratado II e três (4,99%) do grupo tratado III.

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna - piloereção, hipo ou hipermotilidade no interior da gaiola, estereotípias, cromodaciorréia, diarréia, perdas sanguíneas vaginais e mortes - em

nenhum dos grupos estudados. Além disso, a estimativa do consumo de ração não apresenta diferença significativa entre os grupos tratados e controle (Gráfico 1). Também, não houve ganho significativo de peso ou perda durante o experimento (Gráfico 2). A tabela 1 apresenta os dados relativos à ganho de peso corporal; peso absoluto do fígado materno, rins, supra renais, baço e ovários; número de corpos lúteos; índice de implantação e taxas de reabsorção, perdas pré e pós-embriônica. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. P>0,05.

A tabela 2 resume o número de fetos vivos e fetos mortos, peso fetal médio por ninhada e peso da placenta por ninhada. Não houve diferença significativa em nenhum dos valores observados ($p>0,05$). Nenhuma malformação externa foi detectada durante a análise macroscópica dos fetos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. $P>0,05$.

Não foram encontradas alterações significativas no eritograma ou no leucograma dos grupos avaliados ($p>0,05$). Tampouco a análise bioquímica demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais ($p>0,05$). A tabela 3 resume os valores encontrados. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. $P>0,05$.

4 DISCUSSÃO

Os FE exercem sua ação biológica através de diversos mecanismos, como: mimetizam a ação dos estrogênios endógenos, agem como antagonistas do estrogênio, alteram o padrão de síntese e metabolismo dos estrogênios endógenos e modificam os receptores hormonais (SONNENSCHNEIN et al., 1998).

Na ausência de estrogênio, as isoflavonas têm um fraco efeito estrogênico, mas na presença deste exibem um efeito antiestrogênico (BURTON et al., 1998). Assim a propriedade estrogênica e antiestrogênica dos FE depende da concentração dos mesmos, da concentração dos esteróides sexuais endógenos e do órgão alvo específico envolvido na interação com os receptores de estrogênios (RE). Esse efeito pode ser explicado pela existência de dois tipos de RE: alfa e beta. Os alfa-receptores (RE-a) são os principais receptores encontrados na mama e no útero, e os beta-receptores (RE-b) no osso, no sistema cardiovascular, no trato urinário, sistema nervoso central e sistema imune (GUSTAFSSON, 1999).

Especificamente sobre o osso, os RE estão presentes tanto nos osteoclastos, quanto nos osteoblastos (YAGI et al., 2007). KUIPER et al. (1998) relataram que tanto a genisteína quanto a dadzeína possuem uma ligação mais forte com os RE-b e esta relação pode ser benéfica na prevenção de osteoporose porque a formação óssea é estimulada pela ligação estrogênica com o RE-b (KUIPER et al., 1998; WATANABE et al., 2002).

Em relação aos critérios avaliados para análise da função toxicológica da ipriflavona, a ausência de indícios de toxicidade materna é importante, pois, efeitos fetais adversos durante o desenvolvimento embrionário podem ser relacionados a alterações transitórias ou permanentes na fisiologia materna, mesmo que essa correlação não seja mandatária ou que o mal desenvolvimento fetal não seja a priori causado pela presença de toxicidade materna (CHRISTIAN, 2001).

ALEXANDERSEN et al. (2001) observaram que mulheres na pós-menopausa durante o tratamento com ipriflavona desenvolveram linfopenia, porém estas eram assintomáticas

cl clinicamente e o quadro se resolveu espontaneamente na grande maioria em um ano (ALEXANDERSEN et al., 2001). Já SOUNG et al. (2006) que estudaram o efeito da suplementação com isoflavonas em um grupo semelhante não encontraram este resultado (SOUNG DO et al., 2006). Em nosso estudo não observamos diferenças nos parâmetros hematológicos ou bioquímicos entre os grupos experimentais. Fato também observado por ISHIMI et al. (1999) em um estudo em camundongos, porém usando a genisteína, um tipo de isoflavona (ISHIMI et al., 1999).

Os dados apresentados e inferidos ao mecanismo de ação dos derivados de isoflavona como a ipriflavona apontam para um efeito estrogênico de sua estrutura, observados na interferência da implantação do blastocisto de ratas Wistar quando administrados por via oral. Novos estudos precisam ser realizados para confirmar a ação estrogênica da ipriflavona durante a gestação.

5 REFERÊNCIAS

ALEXANDERSEN, P.; TOUSSAINT, A.; CHRISTIANSEN, C.; et al. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 285, n. 11, p. 1482-1488, 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária [cited 2007]; Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/628_01re.htm.

BURTON, J. L.; WELLS, M. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 55, n. 6, p. 401-407, 2002.

CHAMBÔ FILHO, A.; CHAMBÔ, D.; CHAMBÔ, F. A soja como alimento funcional em ginecologia. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 326-329, 2000.

CHRISTIAN, M.S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology, in Principles and methods of toxicology, A.W. Hayes, Editor. Raven Press: New York, p. 1301-1381, 2001.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; et al. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

GIOSSI, M.; CARUSO, P.; CIVELLI, M.; BONGRANI, S. Inhibition of parathyroid hormone-stimulated resorption in cultured fetal rat long bones by the main metabolites of ipriflavone. **Calcified Tissue International**, New York, v. 58, n. 6, p. 419-422, 1996.

GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 163, n. 3, p. 379-383, 1999.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n.6, p. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HEAD, K.A. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 4, n. 1, p. 10-22, 1999.

ISHIMI, Y.; MIYAURA, C.; OHMURA, M.; et al. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. **Endocrinology**, Springfield, v. 140, n. 4, p. 1893-1900, 1999.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, Springfield, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, 1998.

LÉVAI, F.; VARGAY, Z.; BUJTÁS, G.; TÓTH, K.; KERPEL-FRONIUS, S.; ECKHARDT, S. [Pharmacokinetics and metabolism of ipriflavone in humans. II]. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, Budapest, v. 59, Suppl 1, p. 38-42, 1989.

MOON, Y.; KLIM, S. Y.; JI, H. Y.; et al. Characterization of cytochrome P450s mediating ipriflavone metabolism in human liver microsomes. **Xenobiotica**, London, v. 37, n. 3, p. 246-259, 2007.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 65, n. 1-6, p. 143-150, 1998.

SOUNG DO, Y.; PATADE, A.; KHALIL, D. D.; et al. Soy protein supplementation does not cause lymphocytopenia in postmenopausal women. **Nutrition Journal**, London, v. 5, p. 12, 2006.

YAGI, M.; ONO, Y.; MINEGISHI, T.; UCHIYAMA, T.; et al. Effect of ipriflavone on osteoblasts and osteoclasts during guided bone augmentation. **Journal of Health Science**, v. 53, n. 4, p. 435-442, 2007.

YAMAZAKI, I. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. **Life Sciences**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 757-764, 1986.

YOSHIDA, K.; TSUKAMOTO, T.; TORII, H.; et al. Disposition of ipriflavone (TC-80) in rats and dogs. **Radioisotopes**, Tokyo, v. 34, n. 11, p. 618-623, 1985.