

Desenvolvimento físico e neurocomportamental de prole de ratas Wistar após tratamento com ipriflavona durante a lactação plena

Tatianne Rosa dos Santos^{1*}, Graziela Tonioni de Queiroz², Tânia Toledo de Oliveira³, Martha de Oliveira Guerra², Vera Maria Peters² & Amaury Teixeira Leite Andrade²

¹*Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. Email: tatiannersantos@yahoo.com.br.*

²*Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. Email: grazielaufff@yahoo.com.br; martha.guerra@terra.com; peters.vera@ufjf.edu.br.*

³*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Email: ttoledo@ufv.br.*

Abstract. Physical and neurobehavioral development of rat offspring after maternal exposure to ipriflavone during lactation. The Ipriflavone (7-isopropoxy-3-phenyl-4H-benzopyran-4-one), a synthetic derivative of the isoflavone daidzein, with proven estrogenic activity has been used by women in order to increase bone density and prevent bone loss. Reproductive toxicology studies in the pre-implantation show signs of toxicity, which interferes with implantation of the blastocyst. It was also shown that ipriflavone affects the Hedgehog signaling pathway, important during embryonic development. Studies show that isoflavones are transferred to breast milk which can cause damage to offspring. However no studies were found in toxicology during lactation and development of offspring using the ipriflavone, which is the aim of this work. For the study were used 48 female rats. The animals were randomly divided into four groups (n = 12) experimental control and treated I, II and III. The experimental control group received intragastrically, twice a day, from the 2nd to the 16th days of lactation, 1 ml of distilled water and the treated groups received, by the same procedure, 1 ml of water suspension of ipriflavone at doses of 300, 1500 and 3000mg / kg / dose, respectively. Maternal variables were analyzed: presence of clinical signs of toxicity, body weight gain and feed intake. Maternal behaviors were observed as: breastfeeding posture, organization and maintenance of the nest, the act of recovering, collect pups and licking them. The pups were assessed for physical development and reflexology. As physical variables were analyzed: body weight, eye opening, unfolding of the ears, and appearance of lanugo hair, eruption of upper and lower incisors, the vaginal opening or descent of the testicles. For observing the reflexology development were made the following tests: grip, posture response, dodging the abyss, orientation, and negative geotaxis. In the experimental model studied ipriflavone showed no signs of maternal toxicity, or changes in the physical and reflexology development of offspring.

Keywords: flavonoid, postnatal development, reproductive toxicology.

Resumo. A Ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopiran-4-ona), um derivado sintético da isoflavona

daidzeína, com ação estrogênica comprovada tem sido utilizado por mulheres com objetivo de aumentar a densidade óssea e prevenir a perda óssea. Estudos de toxicologia reprodutiva no período pré-implantacional apontam indícios de toxicidade, interferindo na implantação do blastocisto. Também foi demonstrado que a ipriflavona interfere na via de sinalização Hedgehog, importante no período de desenvolvimento embrionário. Estudos demonstram que as isoflavonas são transferidas para o leite materno o que poderia ocasionar danos a prole. Porém não foram encontrados estudos de toxicologia no período de lactação e desenvolvimento das crias utilizando-se da ipriflavona, sendo este o objetivo desse trabalho. Para o estudo foram utilizadas 48 ratas Wistar. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 12): controle experimental e tratados I, II e III. O grupo controle experimental recebeu via intragástrica, duas vezes ao dia, do 2º ao 16º dia de lactação, 1 ml de água destilada e os grupos tratados receberam; pelo mesmo procedimento, 1 ml de suspensão aquosa de ipriflavona nas doses de 300, 1500 e 3000mg/kg/dose, respectivamente. As variáveis maternas analisadas foram: presença de sinais clínicos de toxicidade; ganho de peso corporal e consumo de ração. Foram observados comportamentos maternos como: postura de amamentação, organização e manutenção do ninho, ato de recuperar, recolher filhotes e lambê-los. Os filhotes foram analisados quanto ao desenvolvimento físico e reflexológico. Como variáveis de desenvolvimento físico foram analisados: peso corporal, abertura dos olhos, desdobramento das orelhas, aparecimento de lanugo e pêlos, erupção dos incisivos superiores e inferiores, a abertura vaginal ou descida dos testículos. Para observação do desenvolvimento reflexológico foram feitos os seguintes testes: prensão palmar, resposta postural, esquivas ao abismo, orientação e geotaxia negativa. No modelo experimental estudado a ipriflavona não demonstrou indícios de toxicidade materna, nem alterações no desenvolvimento físico e reflexológico da prole.

Palavras chave: desenvolvimento pós-natal, flavonóide, toxicologia reprodutiva.

INTRODUÇÃO

Isoflavonas são fitoestrógenos presentes em grãos de soja, que possuem dois anéis fenólicos em sua estrutura, similares ao estrogênio, e são comercializadas com a finalidade de prevenir e/ou tratar doenças como neoplasias, osteoporose, distúrbios cardiovasculares e outros, principalmente associados ao climatério (GARRIDO *et al.*, 2003; BONILLA, 2004).

Os fitoestrógenos podem exercer ação tanto estrogênica como antiestrogênica, mas possuem efeito mais fraco do que os estrogênios

(BAWA, 2010).

Estudos demonstram que neonato exposto à isoflavonas via ingestão de leite apresentam alterações reprodutivas tais como aumento de níveis circulantes de estrogênio em fêmeas (LIU *et al.*, 2007) e hiperplasia mamária em machos, um dos indicadores mais sensíveis de desregulação endócrina pelo estrogênio (LATENDRESSE *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que as isoflavonas e seus metabólitos obtidos através de dietas ricas em fitoestrógenos no período adulto são

capazes de alterar significativamente regiões cerebrais relacionadas ao dimorfismo sexual, aprendizagem, ansiedade e memória (LEPHART *et al.*, 2002).

Das isoflavonas, genisteína e daidzeína parecem exercer a atividade hormonal estrogênica mais potente e, portanto, a maioria das pesquisas tem sido direcionada para essas moléculas (LEPHART *et al.*, 2002).

A ipriflavona é um derivado sintético da daidzeína utilizado com o propósito de aumentar a densidade e prevenir a perda óssea (YAMAZAKI, 1986; HEAD, 1999; CHAMBÔ FILHO, CHAMBÔ *et al.*, 2000). Estudos dos seus efeitos na reprodução demonstraram que a ipriflavona é capaz de inibir a via de sinalização Hedgehog, importante no período de desenvolvimento embrionário, e que se perturbada é capaz de causar defeitos congênitos graves (LIPINSKI & BUSHMAN, 2010). Em estudos anteriores realizados no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora não foram encontrados defeitos congênitos na prole onde mães receberam a ipriflavona por via oral durante os períodos de organogênese (FERNANDES *et al.*, 2011) e fetogênese (BELLEI *et al.*, 2012), porém, assim como a daidzeína (WU *et al.*, 2005), a ipriflavona interferiu na implantação de blastocistos de ratas quando administrada por via oral (FERNANDES *et al.*, 2011).

Visto que substâncias como as isoflavonas são transferidas para o leite materno (DOERGE *et al.*, 2006), a ipriflavona, também

poderia passar pelo leite materno, e, no organismo do filhote, chegar ao cérebro ainda imaturo causando alguma alteração neurológica ou comportamental. Diante do exposto, é importante avaliar o desenvolvimento físico e reflexológico na prole de ratas lactantes, tratadas com ipriflavona durante o período de lactação, sendo esse o objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho foi aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal (protocolo número 029/2009-CEEA, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil).

IPRIFLAVONA

A ipriflavona (Ip) utilizada no experimento é de origem e procedência chinesa, exportada pela empresa Nanjing Wellchem Enterprise CO., Ltd., importada pela empresa Deg – Ativando princípios ISO, lote número 061005 (DCB: 03913.01-5; CAS: 35212-22-7; código: 1,1131-0; fração nº 534068 28/12/06).

MODELO EXPERIMENTAL

Ratas Wistar nulíparas (n=48), com idade compreendida entre 90 e 120 dias, provenientes da colônia *Outbred* do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram acasaladas com machos de fertilidade comprovada, na proporção 2:1, na noite em que estavam na fase de proestro e na manhã seguinte verificou-se o acasalamento através da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (dia 1 pós-coito). No 15º dia os

animais foram separados em gaiolas individuais.

CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram alojados em micro-isoladores, providos de cama de maravalha selecionada, mamadeira para água e cocho para ração peletizada, mantidos em racks com controle de ventilação e temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e localizados em alojamentos com fotoperíodo de 12h claro/ 12h escuro e umidade relativa do ar entre 40-60%.

ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

No 20^o dia os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de doze ratas cada, compreendendo: 1. T0 (0mg/kg/dose); 2. T1 (Ip 300mg/kg/dose); 3. T2 (Ip 1500mg/kg/dose); 4. T3 (Ip 3000mg/kg/dose). As substâncias foram administradas em forma de suspensão aquosa, via intragástrica por gavagem, duas vezes ao dia do 2^o ao 16^o dia de lactação. O grupo T0 recebeu 1 ml de água destilada.

AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE MATERNA

A toxicidade materna foi avaliada conforme descrito por Christian, (2001): peso corporal, hiper ou hipoatividade, piloereção, estereotipia, cromodaciorréia, sangramento vaginal, diarreia e óbito. O consumo de ração foi estimado pela diferença de peso entre a quantidade colocada às 12 horas do dia anterior (40 gramas) e o que restou na gaiola do dia seguinte. Estes parâmetros foram mensurados diariamente antes da gavagem.

Também foram observados comportamentos maternos como: postura de amamentação, organização e manutenção do ninho, ato de recuperar e recolher filhotes e lambê-los (BROWN, 1998).

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DAS CRIAS

Vinte e quatro horas após o nascimento fez-se a pesagem individual e a observação do estado físico de cada filhote. Anotaram-se número de filhotes e proporção entre machos e fêmeas em cada ninhada. A seguir as ninhadas foram padronizadas para conter quatro machos e quatro fêmeas. As ratas que tiveram ninhada com número inferior a oito filhotes foram devolvidas à colônia e repostas. As crias foram identificadas através de tatuagem feita na pele por nanquim.

As crias vivas e mortas foram contadas e as primeiras foram pesadas vinte e quatro horas após o nascimento, e aos quatro, 10, 15, 20 e 25 dias após o parto (BAILEY *et al.*, 2009). Como sinais indicadores do desenvolvimento foram observados: abertura dos olhos, desdobramento das orelhas, aparecimento de lanugo e pêlos, erupção dos incisivos superiores e inferiores, a abertura vaginal ou descida dos testículos. Considerou-se a data em que ocorreu em ambas as estruturas quando se avaliaram estruturas pares (ALDER, 1983; SCHUMARZ *et al.*, 2003).

Para observação do desenvolvimento reflexológico foram feitos os seguintes testes: prensão palmar (Figura 1), resposta postural

(Figura 2), esquiva ao abismo (Figura 3), orientação (Figura 4) e geotaxia negativa (Figura 5). Os testes foram feitos diariamente após o período de gavagem, até que todos os reflexos aparecessem, tendo duração de 15 segundos cada (SILVA, 1991).

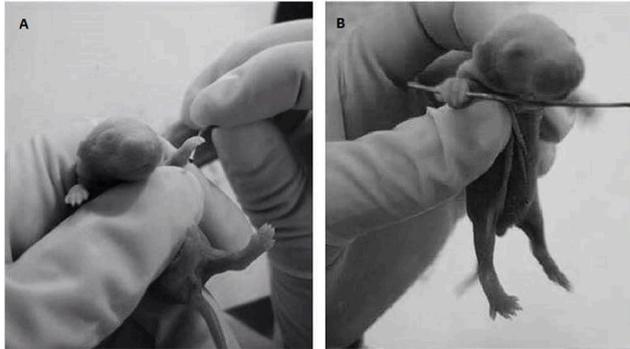


Figura 1. Teste de preensão palmar. A - Observe a ausência de reflexo. B - Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal).

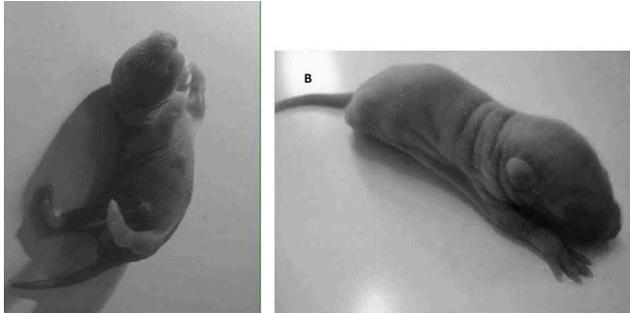


Figura 2. Teste de resposta postural. A - Observe a ausência de reflexo. B - Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal).

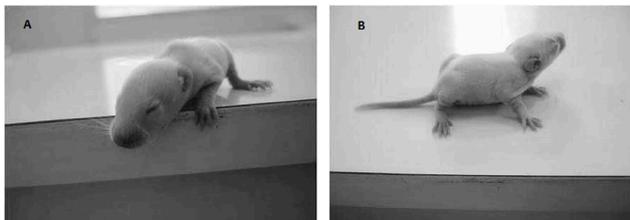


Figura 3. Teste de esquiva ao abismo. A - Observe a ausência de reflexo. B - Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal).



Figura 4. Teste de orientação. (Arquivo pessoal).

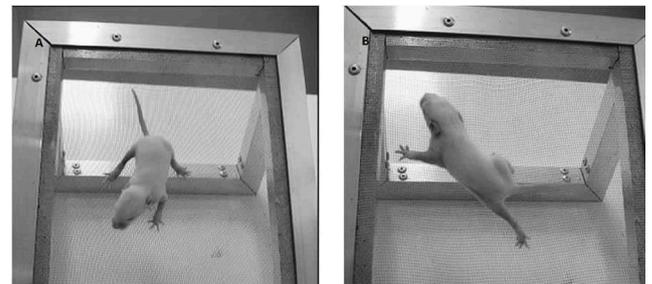


Figura 5. Teste de geotaxia negativa. A - Observe a ausência de reflexo. B - Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal).

ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA seguida de teste de Dunnett e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Mann-Whitney. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

AVALIAÇÃO MATERNA

O comportamento materno não mostrou alterações nos grupos estudados. A

postura de amamentação, construção do ninho, o recolhimento dos filhotes e ato de lambar as crias foram semelhantes entre os grupos.

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna em nenhum dos grupos estudados. Também não foram observadas diferenças significativas do consumo alimentar (Figura 6) ou peso materno (Figura 7) entre o grupo controle e os grupos tratados.

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REFLEXOLÓGICO DA PROLE

A tabela 1 mostra o número de óbitos ocorridas durante o período de observação da prole.

Não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso dos filhotes do sexo masculino (dados não mostrados). Também não foram encontradas diferenças significativas no ganho de peso dos filhotes do sexo feminino (dados não mostrados).

As tabelas 2 e 3 mostram os parâmetros de desenvolvimento físico e reflexológico da prole, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros analisados.

DISCUSSÃO

O comportamento materno em mamíferos é responsável por assegurar a sobrevivência da prole (MARCHLEWSKA-KOJ

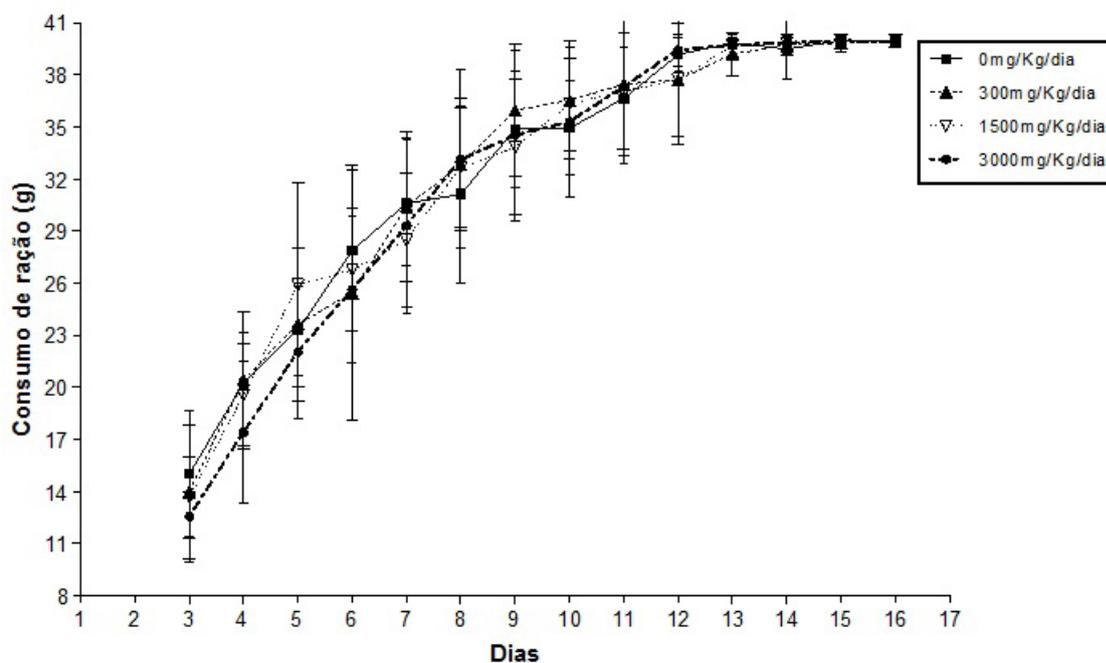


Figura 6. Consumo estimado de ração por ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 300, 1500 e 3000 mg/Kg/dia. Os resultados mostram o consumo médio diário do 2o ao 16o dia de lactação. Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p > 0,05$, $n = 12$.

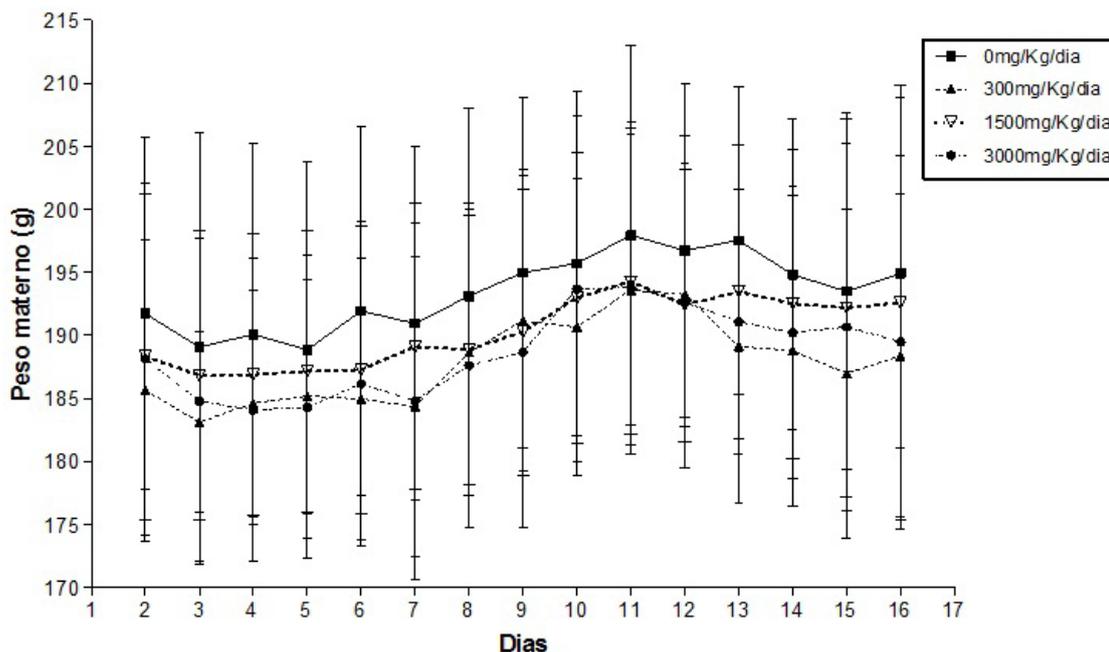


Figura 7. Peso corporal materno de ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero, 300, 1500 e 3000 mg/Kg/dia. Os resultados mostram o peso médio do 2o ao 16o dia de lactação. Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p > 0,05$, $n = 12$.

Tabela 1. Total de óbitos ocorridos em crias de ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero, 300, 1500 e 3000 mg/Kg/dia.

Parâmetros	Sexo	Ipriflavona (mg/Kg/dia)			
		0	300	1500	3000
Mortes até o 5º dia de vida	M	0	0	1	0
	F	0	0	0	0
Mortes até o 15º dia de vida	M	1	0	0	0
	F	0	0	0	0
Mortes a partir do 15º dia de vida	M	1	2	0	0
	F	0	0	0	0
Total		2	2	1	0

F sexo feminino ($n = 48$); M sexo masculino ($n = 48$)

Tabela 2. Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos filhotes de sexo masculino e feminino de ratas lactantes submetidas ou não, do 2o ao 16o dia de lactação à administração da suspensão aquosa de ipriflavona.

Variável	Sexo	Ipriflavona (mg/Kg/dia)			
		0 n = 46 (M); 48 (F)	300 n = 46 (M); 48 (F)	1500 n = 47 (M); 48 (F)	3000 n = 48 (M); 48 (F)
Aparecimento lanugo	M	4,0 ± 0,4	4,0 ± 0,4	4,0 ± 0,5	3,9 ± 0,4
	F	4,1 ± 0,5	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5
Desdobramento orelha	M	4,6 ± 0,5	4,6 ± 0,4	4,8 ± 0,3	4,7 ± 0,5
	F	4,7 ± 0,4	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,4	4,7 ± 0,4
Erupção incisivo superior	M	9,4 ± 0,8	9,7 ± 0,8	9,6 ± 0,7	9,7 ± 0,9
	F	9,6 ± 0,8	9,9 ± 0,8	9,9 ± 1,0	9,8 ± 0,8
Erupção incisivo Inferior	M	11,5 ± 1,0	11,5 ± 0,8	11,57 ± 0,68	11,5 ± 0,7
	F	11,5 ± 0,9	11,7 ± 0,7	11,75 ± 0,78	11,6 ± 0,6
Aparecimento do pelo	M	9,8 ± 0,3	9,8 ± 0,3	9,8 ± 0,3	9,8 ± 0,3
	F	9,7 ± 0,4	9,7 ± 0,4	9,7 ± 0,4	9,8 ± 0,4
Abertura do olho	M	16,9 ± 0,5	16,9 ± 0,5	16,9 ± 0,6	17,0 ± 0,6
	F	16,8 ± 0,6	16,8 ± 0,6	16,7 ± 0,5	17,1 ± 0,8
Descida testículo	M	21,1 ± 0,8	20,8 ± 0,9	21,0 ± 0,8	21,0 ± 0,9
Abertura vaginal	F	36,9 ± 2,0	36,5 ± 2,4	36,3 ± 2,7	36,6 ± 2,3

Os dados são apresentados em média ± desvio padrão de dias de vida. $p > 0,05$.

Tabela 3. Desenvolvimento reflexológico (em dia de aparecimento) dos filhotes de sexo masculino e feminino de ratas lactantes submetidas ou não, do 2o ao 16o dia de lactação à administração da suspensão aquosa de ipriflavona.

Variável	Sexo	Ipriflavona (mg/Kg/dia)			
		0 n = 46 (M); 48 (F)	300 n = 46 (M); 48 (F)	1500 n = 47 (M); 48 (F)	3000 n = 48 (M); 48 (F)
Ap. preensão palmar	M	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
	F	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
Des. Preensão palmar	M	8,3 ± 1,9	8,4 ± 1,5	8,2 ± 1,7	8,1 ± 1,6
	F	8,6 ± 1,6	8,1 ± 1,6	8,3 ± 1,6	8,3 ± 1,5
Resposta postural	M	3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,5
	F	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5
Esquiva ao abismo	M	7,3 ± 1,2	7,2 ± 1,2	7,3 ± 1,1	7,3 ± 1,3
	F	7,4 ± 1,4	7,4 ± 1,3	7,3 ± 1,3	7,3 ± 1,3
Geotaxia negativa	M	7,9 ± 1,3	7,7 ± 1,7	8,0 ± 1,6	7,8 ± 1,6
	F	7,6 ± 1,5	8,0 ± 1,4	7,8 ± 1,5	8,1 ± 1,6
Orientação	M	9,5 ± 1,8	9,0 ± 1,7	9,4 ± 1,6	9,0 ± 1,6
	F	10,1 ± 1,8	9,7 ± 1,6	9,5 ± 1,7	9,5 ± 1,3

$P > 0,05$. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão de dias de vida.

et al., 1999) e promove desenvolvimento adequado a médio e longo prazo (POINDRON, 2005). Mudanças na interação da mãe com seus descendentes podem interferir com a maturação neurocomportamental da prole (SPEAR & FILE, 1996). Além disso, tanto o bem estar físico quanto o estado de saúde materna são essenciais para o desenvolvimento físico da prole (CHAHOU *et al.*, 1999) e ambos podem ser afetados por substâncias endógenas ou exógenas que possam causar toxicidade materna.

A toxicidade materna pode ser observada através de alterações no peso corporal e consumo de alimento; além da presença de sinais clínicos indicativos de estresse materno. No presente trabalho não foram observadas alterações comportamentais, no peso materno ou consumo de ração; nem a presença de sinais clínicos indicativos de toxicidade, sugerindo uma possível ausência de toxicidade da suspensão aquosa de ipriflavona no organismo materno.

A lactação é o evento que provê à cria todo o alimento necessário para seu desenvolvimento. O complexo mecanismo de lactação envolve hormônios como o estrogênio e a progesterona. Sabe-se que a ipriflavona apresenta efeitos inibitórios do citocromo p450 que pode, indiretamente, reduzir a síntese de hormônios esteroidianos devido à redução de colesterol e, por essa via, modificar a produção de leite materno (SCOTT & ELMER, 2002). Além disso, foi demonstrado que a daidzeína, precursora da ipriflavona, quando administrada por via subcutânea, é capaz de diminuir a concentração

de progesterona interferindo no eixo hipotálamo hipófise (WU *et al.*, 2005); o que também poderia modificar a produção do leite materno. Embora nesse estudo não tenha testado a passagem da ipriflavona para o leite materno, existe a possibilidade de que isto tenha ocorrido uma vez que vários autores relataram efeito das isoflavonas na prole, através da ingestão do leite (DOERGE *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007).

Estudos prévios com a genisteína indicam menor ganho de peso em neonatos expostos à isoflavona (DELLOS *et al.*, 2001), entretanto, no presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas no peso corporal dos animais submetidos a tratamento. Do mesmo modo o leite materno não parece ter sofrido alterações qualitativas ou quantitativas que comprometessem o desenvolvimento normal das crias a se julgar pelo número semelhante de sobreviventes e sua massa corporal, considerada como o melhor indicador de desenvolvimento físico das crias (ICH, 2005), visto que aproximadamente 50% do ganho de peso se devem ao consumo de leite materno (DOERGE *et al.*, 2006). Além disso, os demais indicadores físicos de desenvolvimento da cria não diferiram entre os filhotes de mães tratadas e não tratadas com ipriflavona.

Os neonatos não apresentam seus sistemas orgânicos completamente amadurecidos. O fígado tem níveis reduzidos de enzimas do citocromo p450, as principais enzimas metabolizadoras de drogas, o que torna seu metabolismo ineficaz (GOW *et al.*, 2001).

A barreira hematoencefálica ainda não está totalmente formada, permitindo a passagem de substâncias químicas o que não acontece com o adulto. O desenvolvimento de receptores e transmissores do sistema nervoso ainda está incompleto o que só acontece nas primeiras 3-4 semanas de vida (ANDERSEN *et al.*, 2000). Conseqüentemente, agentes tóxicos que possam passar pelo leite materno, ingeridos pela cria, podem não ser adequadamente metabolizados, passar para a corrente circulatória, atravessar a barreira hematoencefálica e lesar o cérebro do recém nascido.

DOERGE *et al.* (2001) demonstraram que a administração oral da isoflavona genisteína a ratas gestantes resultou em níveis cerebrais da substância cinco vezes maiores em fetos do que em um adulto exposto. A maturação do cérebro depende de diversos fatores, entre eles do estrogênio que em alguns locais do cérebro promove apoptose e em outras protege da apoptose (MCCARTHY, 2008). Já foi demonstrado que a ipriflavona possui um efeito apoptótico em células gástricas (TANI, 2004). Dessa forma, poderia se supor que a ipriflavona pudesse chegar até ao cérebro do neonato e alterar seus mecanismos reflexos, o que não ocorreu, levando à suposição que a ipriflavona pode não passar pelo leite ou passar mas não alterar o desenvolvimento fisiológico normal do cérebro do neonato.

Conclui-se que a suspensão aquosa de ipriflavona, não apresentou indícios de toxicidade materna nem de alterações no desenvolvimento

físico e reflexológico da prole no neste modelo experimental.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Rede Mineira de Bioterismo (172/08) e a Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia de Produtos terapêuticos (173/08), FAPEMIG, Brasil, para o apoio financeiro a esta pesquisa, e também ao professor Luis Cláudio Ribeiro do Departamento de Estatística da UFJF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDER, S. 1983. Behavioral teratology, pp.57-66 In: PRESS, R. (ed.). **Application of behavioral pharmacology in toxicology**. New York.
- ANDERSEN, H.R.; NIELSEN, J.B. & GRANDJEAN, P. 2000. Toxicology evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. **Toxicology** 144: 121-127.
- BAILEY, G.P.; WISE, L.D.; BUSCHMANN, J.; HURTT, M.; FISHER J.E. 2009. Pre- and postnatal developmental toxicity study design for pharmaceuticals. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol** 86 (6): 437-445.
- BAWA, S. 2010. The significance of soy protein and soy bioactive compounds in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. **J Osteoporos** 2010: 891058.
- BELLEI, P.M.; TERRA, M.M.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O.; ANDRADE, A.T.L. 2012. Efeito da ipriflavona sobre ratas Wistar e suas ninhadas. **Rev Bras Ginecol Obstet** 34 (1):

- 22-27.
- BONILLA, C.A. 2004. Isoflavonas en ginecología, terapia no convencional. **Rev Colomb Obstet Ginecol** 55 (3): 209-217.
- BROWN, R.E. 1998. Hormônios e comportamento parental, pp.53-99. In: ETOLOGIA, S.B.D. (ed.). **Comportamento materno em mamíferos: bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos**. São Paulo.
- CHAMBÔ FILHO, A.; CHAMBÔ, D. & CHAMBÔ, F.A. 2000. A soja como alimento funcional em ginecologia. **Rev Bras Nutr Clin** 15 (2): 326-329.
- CHAHOU, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L.; FAGI, A.S. 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reprod Toxicol** 13: 375-381.
- DECLOS, K.B.; BUCCI, T.J.; LOMAX, L.G.; LATENDRESSE, J.R.; WARBRITTON, A.; NEWBOLD, R.R. 2001. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. **Reprod Toxicol** 15 (6): 647-663.
- DOERGE, D.R.; TWADDLE, N.C.; CHURCHWELL, M.I.; NEWBOLD, R.R.; DELCLOS, K.B. 2006. Lactational transfer of the soy isoflavone, genistein, in Sprague-Dawley rats consuming dietary genistein. **Reprod Toxicol** 21 (3): 307-312.
- DOERGE, D.R.; CHURCHWELL, M.I.; CHANG, H.C.; DELCLOS, K.B. 2001. Placental transfer of the soy isoflavone, genistein, following oral administration to Sprague-Dawley rats. **Reprod Toxicol** 15 (2): 105-110.
- FERNANDES, E.S.; SANTOS, T.R.; OLIVEIRA, T.T.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; ANDRADEM T.L. 2011. Avaliação do potencial interceptivo da ipriflavona em ratas Wistar. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais** 3: 7-12.
- GARRIDO, A.; DE LA MAZA, M.P.; VALLADARES, L. 2003. Dietary phytoestrogen and its potential benefits in adult human health. **Rev Med Chil** 131 (11): 1321-1328.
- GOW, P.J.; GHABRIAL, H.; SMALLWOOD, R.A.; MORGAN, D.J.; CHING, M.S. 2001. Neonatal hepatic drug elimination. **Pharmacology & Toxicology** 88: 3-15.
- HEAD, K.A. 1999. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. **Altern Med Rev** 4 (1): 10-22.
- ICH. International conference of harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use - Guideline: Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity male fertility S5 (R2). 2005.
- LATENDRESSE, J.R.; BUCCI, T.J.; OLSON, G.; MELLICK, P.; WEIS, C.C.; THORN, B.; NEWBOLD, R.R.; DELCLOS, K.B. 2009. Genistein and ethinyl estradiol dietary exposure in multigenerational and chronic studies induce similar proliferative lesions in

- mammary gland of male Sprague-Dawley rats. **Reprod Toxicol** 28 (3): 342-353.
- LEPHART, E.D.; WEST, T.W.; WEBER, K.S.; RHEES, R.W.; SETCHEL, K.D.; ADLERCREUTZ, H.; LUND, T.D. 2002. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. **Neurotoxicol Teratol** 24 (1): 5-1.
- LIPINSKI, R.J. & BUSHMAN, W. 2010. Identification of Hedgehog signaling inhibitors with relevant human exposure by small molecule screening. **Toxicol in vitro** 24 (5): 1404-1409.
- LIU, Z.; ZHANG, X.; LI, L.; ZHANG, W.; CUI, W.; SONG, Y.; WANG, W.; JIA, X.; LI, N.; YAN, W. 2007. Effects of lactational exposure to soy isoflavones on reproductive system in neonatal female rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 102: 317-324.
- MCCARTHY, M.M. 2008. Estradiol and the developing brain. **Physiol Rev** 88 (1): 91-124.
- MARCHLEWSKA-KOJ, A.; KAPUSTA, J. & OLEJNICZAK, P. 1999. Ultrasonic response of CBA newborn mice to bedding odour. **Behaviour** 136 (3): 269-278.
- POINDRON, P. 2005. Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. **Reprod Nutr Dev** 45: 341-351.
- SCOTT, G.N. & ELMER, G.W. 2002. Update on natural product--drug interactions. **Am J Health Syst Pharm** 59 (4): 339-347.
- SILVA, V.A. 1991. Métodos experimentais utilizados na avaliação de efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento, pp. 219-241. *In*: RABELO-GAY, M. N. (ed.). **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese (métodos e critérios de avaliação)**. São Paulo.
- SPEAR, L.P. & FILE, S.E. 1996. Methodological considerations in neurobehavioral teratology. **Pharmacol Biochem Behav** 55 (4): 455-457.
- TANI, S.; MATSUDA, K. & TANAKA, T. Induction of apoptosis in cultured rat gastric epithelial cells by ipriflavone: comparison with indomethacin. **Biological e Pharmaceutical Bulletin** 27 (5): 647-651.
- WU, Z.; YANG, Y.; CHEN, Y.; XIA, G.; ZHANG, R. 2005. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. **Food Chem Toxicol** 43 (1): 167-172.
- YAMAZAKI, I. 1986. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. **Life Sci** 38 (8): 757-764.

Recebido: 06/04/2016

Revisado: 25/07/2016

Aceito: 01/09/2016