

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

**DESENVOLVIMENTO NEONATAL DE CRIAS DE RATAS WISTAR (*Rattus  
Norvegicus* BERKENHOUT, 1769) TRATADAS COM O FLAVONÓIDE  
IPRIFLAVONA DURANTE A LACTAÇÃO PLENA**

Tatianne Rosa dos Santos

Juiz de Fora, Minas Gerais

2011

Tatianne Rosa dos Santos

**DESENVOLVIMENTO NEONATAL DE CRIAS DE RATAS WISTAR (*Rattus  
Norvegicus* BERKENHOUT, 1769) TRATADAS COM O FLAVONÓIDE  
IPRIFLAVONA DURANTE A LACTAÇÃO PLENA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Peters

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Martha de Oliveira Guerra

Juiz de Fora, Minas Gerais

2011

Tatianne Rosa dos Santos

**DESENVOLVIMENTO NEONATAL DE CRIAS DE RATAS WISTAR (*Rattus  
Norvegicus* BERKENHOUT, 1769) TRATADAS COM O FLAVONÓIDE  
IPRIFLAVONA DURANTE A LACTAÇÃO PLENA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Peters (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr<sup>a</sup>. Luciana Valente Borges  
Universidade Tiradentes

---

Dr. Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmão  
pelo incentivo.

Ao Fábio, meu namorado, pela compreensão,  
dedicação e incentivo

## AGRADECIMENTOS

Chegar ao término desse trabalho que exige tanta dedicação e empenho se torna mais fácil quando se está cercada de pessoas especiais. Agradeço com muito carinho estas pessoas que fizeram parte dessa etapa da minha vida e foram fundamentais para a concretização desse trabalho.

Aos meus familiares, pelo amor e ajuda, cada um da sua maneira.

Ao Fábio, pelo carinho, apoio, incentivo, compreensão, paciência e por sempre estar do meu lado.

A todos integrantes do CBR, pelo acolhimento, trabalho e a amizade.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Vera Peters, dentre tantos outros motivos, pelos ensinamentos passados e pelo exemplo de amor e dedicação a pesquisa.

A Prof<sup>a</sup> Martha, pela convivência que é sempre um aprendizado e exemplo, pela enorme ajuda nos trabalhos e na dissertação e pelo carinho com que nos passa tantos conhecimentos.

Ao Centro de Biologia da Reprodução e as Redes Mineiras de Bioterismo e Toxicologia, pelos recursos oferecidos.

A minha amiga Grazi com quem dividi a maioria dos momentos desse trabalho, as aflições e conquistas. A amizade construída durante esse tempo foi essencial.

Ao amigo Renato por compartilhar todas as manhãs de trabalho, pela companhia, pela ajuda no trabalho e principalmente pela amizade.

A amiga Edith, pelas caronas, auxílio no trabalho, conversas e desabafos.

A amiga Dayana, pela enorme ajuda no experimento.

Ao Eduardo, pelos conhecimentos passados e pelo exemplo de profissionalismo.

A amiga Thaila, que mesmo de longe acompanhou minhas aflições.

A amiga Raquel, pelo carinho, incentivo, convivência e amizade.

Aos amigos que fizeram com que essa caminhada fosse mais leve.

Aos professores do Programa de Pós Graduação, por compartilharem conosco seus conhecimentos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira participaram desse trabalho.

Muito obrigada!!

## RESUMO

A Ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-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 60 ratas Wistar, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n = 12): controle da colônia, controle experimental e tratados 1, 2 e 3. O primeiro grupo não sofreu nenhum tipo de manipulação e foi utilizado para verificar os possíveis efeitos da gavagem. O segundo grupo 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 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia, 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: preensão palmar, resposta postural, esquivar 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: Ipriflavona, Desenvolvimento pós-natal, Lactação, Flavonóide

## ABSTRACT

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 60 female Wistar rats from the vivarium of the Center for Reproductive Biology, Federal University of Juiz de Fora. The animals were randomly divided into five groups (n = 12) control of the colony, experimental control and treated 1, 2 and 3. The first group did not have any type of manipulation and was used to assess the possible effects of gavage. The second group received intragastrically, twice a day, from the 2<sup>nd</sup> to the 16<sup>th</sup> 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 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/day, respectively. Maternal variables were analyzed: presence of clinical signs of toxicity, body weight gain and food intake. Maternal behaviors were observed as: breastfeeding posture, organization and maintenance of the nest, the act of recovering, collecting 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 the following tests were made: 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:** Ipriflavone, Postnatal development, lactation, flavonoid

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estruturas químicas do estradiol e do equol. Observe a similaridade entre o estradiol e a isoflavona. Fonte: adaptado de (Frota, Matias et al., 2010). .....23
- Figura 2** - Estruturas químicas das isoflavonas em suas formas glicosídicas e agliconas. Fonte: (César, Braga et al., 2007).....24
- Figura 3** – Estrutura química da ipriflavona. Fonte: adaptado de (Lipinski e Bushman, 2010).....27
- Figura 4** – Esquema ilustrativo da distribuição dos animais entre os grupos experimentais ..32
- Figura 5** – Teste de preensão palmar. Observe a ausência de reflexo (Arquivo pessoal) ..... 35
- Figura 6** – Teste de preensão palmar. Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal).....35
- Figura 7** – Teste de resposta postural. Observe a ausência de reflexo (Arquivo pessoal) .....35
- Figura 8** – Teste de resposta postural. Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal) ..... 35
- Figura 9** – Teste de esquiva ao abismo. Observe a ausência de reflexo (Arquivo pessoal)....36
- Figura 10** – Teste de esquiva ao abismo. Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal)..36
- Figura 11** – Teste de orientação (Arquivo pessoal).....36
- Figura 12** – Teste de geotaxia negativa. Observe a ausência de reflexo (Arquivo pessoal) ...37
- Figura. 13** – Teste de geotaxia negativa. Observe a presença de reflexo (Arquivo pessoal) ..37
- Figura 14** - Consumo estimado de ração por ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia. Os resultados mostram o consumo médio diário do 2<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de lactação.. ..... 39
- Figura 15** - Peso corporal materno de ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia. Os resultados mostram o peso médio do 2<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de lactação.....40
- Figura. 16** - Peso corporal de crias do sexo masculino, desde as primeiras 24 horas após o nascimento (dia 1) ao 25<sup>o</sup> dia de vida, provenientes de mães tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia.....41
- Figura 17** - Peso corporal de crias do sexo feminino, desde as primeiras 24 horas após o nascimento (dia 1) ao 25<sup>o</sup> dia de vida, provenientes de mães tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia.....42

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Número de mortes ocorridas em crias de ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia. ....40
- Tabela 2** – Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos filhotes de sexo masculino e feminino de ratas lactantes submetidas ou não, do 2<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de lactação à administração da suspensão aquosa de ipriflavona.....43
- Tabela 3** - Desenvolvimento reflexológico (em dia de aparecimento) dos filhotes de sexo masculino e feminino de ratas lactantes submetidas ou não, do 2<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de lactação à administração da suspensão aquosa de ipriflavona. ....44

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Comportamento materno .....	15
2.2 Lactação.....	18
2.2.1 Ejeção do leite .....	19
2.2.2 Eliminação de agentes pelo leite .....	20
2.3 Toxicologia reprodutiva .....	21
2.4 Isoflavonas.....	22
2.4.1 Efeitos na reprodução .....	25
2.4.2 Efeitos no comportamento.....	26
2.5 Ipriflavona .....	26
3. HIPÓTESE .....	29
4. OBJETIVOS .....	30
4.1 Geral .....	30
4.2 Específicos.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 Ipriflavona .....	31
5.2 Modelo Experimental .....	31
5.3 Condições de criação e manutenção dos animais.....	31
5.4 Organização dos grupos experimentais .....	32
5.5 Avaliação de toxicidade materna.....	33
5.6 Avaliação do desenvolvimento neonatal das crias .....	33
5.7 Estatística.....	37
5.8 Aprovação do Comitê de Ética .....	38
6. RESULTADOS .....	39

6.1 Avaliação materna .....	39
6.2 Avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico da prole.....	40
7. DISCUSSÃO .....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## 1. 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, De La Maza *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 neonatos expostos às isoflavonas através de ingestão de leite materno apresentam alterações reprodutivas tais como aumento de níveis circulantes de estrogênio em fêmeas (Liu, Zhang *et al.*, 2007) e hiperplasia mamária em machos, um dos indicadores mais sensíveis de desregulação endócrina pelo estrogênio (Latendresse, Bucci *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, West *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, West *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 e Bushman, 2010). Em estudos 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 e fetogênese (dados não publicados), porém, assim como a daidzeína (Wu, Yang *et al.*, 2005), a ipriflavona interferiu na implantação de blastocistos de ratas quando administrada por via oral.

Os laboratórios farmacêuticos responsáveis pela comercialização da ipriflavona não indicam o uso da ipriflavona no período da lactação, visto que essa substância pode passar pelo leite materno. Com isso essa substância no organismo do filhote poderia chegar até o cérebro e causar alguma alteração neurológica ou comportamental, dado que ainda não foi pesquisado e que é o objeto do presente trabalho.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Comportamento materno

Em mamíferos, é indispensável o desempenho normal das funções maternas para a saúde dos filhotes durante o desenvolvimento embriofetal e logo após o nascimento, uma vez que alterações do seu metabolismo por doença, estresse ou toxicidade se refletem no desenvolvimento da cria (Sodersten e Eneroth, 1984; Champagne, Francis *et al.*, 2003; Popeski e Woodside, 2004).

Os sinais tradicionalmente observados de toxicidade materna em estudos experimentais são: decréscimo no ganho de peso, diminuição do consumo de água e alimento, sinais clínicos de toxicidade e mortalidade (Castro, 2004; ICH, 2005).

O comportamento materno em mamíferos compreende o cuidado que as mães oferecem aos filhotes, do nascimento até o período em que eles se tornem capazes de assegurar sua sobrevivência (Marchlewska-Koj, Kapusta *et al.*, 1999). Além da sobrevivência das crias, a qualidade dos cuidados maternos influenciará o desenvolvimento a curto, médio e longo prazo (Poindron, 2005). Meaney (2001) demonstra que a separação precoce entre os filhotes e a mãe, ou a qualidade do comportamento materno comprometida podem influenciar o desenvolvimento do recém-nascido e afetar a sua sensibilidade ao estresse, e em fêmeas pode comprometer a expressão de seu futuro comportamento maternal, pois esses efeitos são transmitidos em gerações subseqüentes.

O comportamento materno envolve diferentes fatores. O substrato neural central, bem como o aparelho sensorial periférico da fêmea adulta está "sensibilizado" por fatores associados à gestação e parto (Kristal, 2009). A natureza desses fatores pode variar entre as espécies, sendo os mais frequentes a concentração de estradiol circulante, os estímulos resultantes da expulsão do feto e a concentração de ocitocina intracerebral. Em ratos, após a sensibilização prévia pelo estrogênio, a prolactina tem papel acentuado na manifestação do comportamento materno. Outros indutores do comportamento maternos são prostaglandinas e opióides (Panksepp, Nelson *et al.*, 1994), estes últimos produzindo hipotalgesia. Níveis de opióides endógenos em ratos aumentam no final da gravidez, há um pico por volta da hora do parto e retorna aos níveis normais de 12 a 18 horas depois. Além disso, a rata ingere a placenta, rica em opióides, após o parto (Catheline, Touquet *et al.*, 2006).

Esses fatores induzem um período de receptividade específica para algumas pistas sensoriais - táteis, olfativas, auditivas - produzidas pelo recém nascido, principalmente sinais táteis que se localizam ao redor do focinho e do abdômen. A rata que está amamentando responde mais intensamente ao ultra-som de frequências 50 kHz, emitidos pelo recém-nascido, do que a fêmea não prenhe, e esta sensibilidade está sob a influência de estrógenos (Poindron, 2005).

Os mecanismos neurobiológicos envolvidos na ativação do comportamento materno têm como alvo principalmente a área pré-óptica medial e o núcleo paraventricular do hipotálamo. A área pré-óptica medial é uma estrutura essencial para a ativação do cuidado materno, alvo da ação dos estrógenos. O núcleo paraventricular do hipotálamo desempenha papel importante no parto, por ser fonte de ocitocina que induz as contrações uterinas facilitando o comportamento materno (Kendrick, 2000; Poindron, 2005).

Em ratos, o comportamento materno se expressa muito rapidamente (Poindron, 2005), mesmo antes do parto, quando as fêmeas gestantes lambem seus mamilos, o que favorece o crescimento mamário e a função secretora (Brown, 1998) e iniciam a construção do ninho quatro a cinco dias antes do parto. Após o parto verifica-se a postura de amamentação, o ato de recolher e lambar os filhotes e a manutenção do ninho de maneira adequada a manter a temperatura das crias (Brown, 1998).

Ao nascimento as crias são completamente dependentes de suas mães, os filhotes nascem bastante imaturos, apresentam capacidades sensoriais ainda limitadas; são incapazes de ver, ouvir e se locomover de maneira ordenada. Não conseguem regular a temperatura corporal de forma independente e se alimentar sozinhos (Vieira, 2003). Também não possuem o reflexo urinário e para defecação, funções fisiológicas que são realizadas pelo estímulo materno, quando a mãe lambe a região anogenital das crias para eliminação de resíduos (Kristal, 2009). Após o parto, estímulos emitidos pelos filhotes de forma passiva (temperatura, odor) ou ativos (vocalização), e ainda estímulos visuais, táteis, auditivos, sensoriais e olfativos, são necessários para a manutenção do comportamento materno (Barnett e Burn, 1970; Brown, 1998).

Logo que o parto ocorre, as mães gastam a maioria do seu tempo cuidando do ninho, amamentando e recuperando os filhotes. O cuidado com o ninho é representado em organizá-lo de forma a manter as crias aquecidas. A manutenção do ninho é realizada até que os filhotes fiquem ativos, abandonando-o (Barnett e Burn, 1970). Acreditava-se que a duração

dos surtos de amamentação fosse atribuída a termorregulação por parte da mãe, mas estudos mais recentes rejeitam essa hipótese (Stern e Azzara, 2002).

Durante o período de lactação as mães desenvolvem um comportamento de agressão acentuado a invasores, capaz de aumentar a sobrevivência e adaptação da cria. Esse mecanismo é dependente de estímulos olfatórios e táteis, e envolve uma complexa interação neural e hormonal. Entre esses hormônios, o estrogênio é um fator crítico em desencadear a agressão materna, uma vez que ratas virgens tratadas com esse hormônio podem desencadear tal comportamento de ataque. A progesterona também parece ter uma participação nesse comportamento, porém os mecanismos específicos da ação desse hormônio não estão bem elucidados (Scárdula e Bastos, 2009).

As crias de ratas podem iniciar sua amamentação depois de 15 a 29 minutos do nascimento. Nos primeiros dias após o parto (de 8 a 12 dias de vida pós-natal) a mãe gasta quase todo o seu tempo na construção e manutenção do ninho e recolhe os filhotes que o deixam, exibindo postura de amamentação em 70% do tempo (Brown, 1998). Nesses dias é ela que se aproxima dos filhotes para iniciar a amamentação, após essa idade são os filhotes que se aproximam da mãe para a amamentação. Os filhotes localizam a mãe pelo odor anal liberado por ela, possivelmente um feromônio (Brown, 1998).

Com três semanas de idade, os filhotes começam a exigir mais alimento que a mãe pode fornecer, e os dentes em crescimento tornam-se uma fonte de irritação e dor para ela. A mãe começa a evitar os filhotes enterrando-se na maravalha ou pressionando sua superfície ventral contra o chão. Assim os filhotes são forçados a se sustentarem de outra forma e o desmame é realizado (Kristal, 2009).

Na colônia do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF os ratos começam a ingerir alimento sólido por volta do 16º dia de idade (Motta, Peters *et al.*, 2002). Aos 18 dias de idade a mãe gradualmente os desmamam através de recusas de amamentação e rejeitando-os nas suas tentativas de mamar. As mudanças no comportamento materno mostram-se assim, sincronizadas com o desenvolvimento dos filhotes, existindo um *feedback* na relação mãe-filhote que regula a quantidade de comportamento materno apresentado (Brown, 1998).

## 2.2 Lactação

A lactação é uma característica exclusiva dos mamíferos. É o passo final do ciclo reprodutivo desses animais (Tucker, 1994), tendo como objetivo prover o recém nascido dos nutrientes necessários à sua sobrevivência (Souza e Hegg, 1993). Um programa cuidadosamente equilibrado de diferenciação da glândula mamária durante a gravidez é fundamental para o aleitamento bem sucedido (Neville, 2006).

Diferentemente da maioria dos órgãos de secreção, a capacidade de secreção de leite desenvolve-se no adulto e é dirigida por hormônios reprodutivos. Os hormônios da gravidez, prolactina, lactogênio placentário, hormônio do crescimento, e progesterona, cooperam para produzir uma glândula que é totalmente desenvolvida, mas não funcional. O desenvolvimento ductal necessita da presença de estrógenos, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e hormônio do crescimento (GH). A atividade secretora começa em torno do parto, com a retirada da progesterona e a conservação da prolactina e glicocorticóides (Neville, 2006).

A prolactina, secretada pelas células da hipófise anterior, sabidamente estimula as glândulas mamárias e promove a lactação. A secreção de prolactina pituitária é regulada positivamente e negativamente, mas é controlada principalmente por fatores inibitórios provenientes do hipotálamo, sendo o mais importante deles a dopamina, que age por intermédio da subclasse D2 de receptores de dopamina presentes nos lactotrofos (Goffin, Binart *et al.*, 2002).

Há evidências de que a prolactina determina diminuição na concentração do hormônio luteinizante (LH) circulante e função anormal do corpo lúteo. Quando em excesso, determina diminuição dos receptores de hormônio folículo estimulante (FSH) e LH nas gônadas, causando insensibilidade às gonadotrofinas. Esta seria uma explicação para os períodos de anestro ou anovulatórios durante boa parte da lactação, na maioria dos mamíferos domésticos (Nogueira, 1999).

A diferenciação funcional da glândula pode ser dividida em três fases: (I) a fase proliferativa da gravidez precoce; (II) a diferenciação secretora inicial na metade da gestação, durante o qual a glândula se torna competente para secretar o leite, e (III) a ativação secretória em torno do parto, quando começa a secreção de leite.

A fase proliferativa é iniciada imediatamente após concepção, atingindo um pico em cerca de cinco dias em ratos. A diferenciação secretora, também chamada de lactogênese I, se inicia em meados da gestação e é marcada por mudanças principalmente bioquímicas. Em ratos, pode ser observado o acúmulo de gotículas lipídicas nas glândulas mamárias em torno do 8º ao 10º dia de gestação. A ativação secretória é o aparecimento da secreção do leite, é por vezes referida como lactogênese II ou início de lactação. Este processo se inicia devido a uma queda nos níveis de progesterona que acontece em torno do parto (Neville, 2006).

O processo contínuo de produção de leite, anteriormente denominado de galactopoiese, consiste em duas fases em mamíferos placentários, a fase colostrar onde o produto de secreção contém grandes concentrações de imunoglobulinas e outras substâncias protetoras, e uma fase de secreção posterior onde são produzidas grandes quantidades de leite (Neville, 2006). O volume produzido depende dos fatores nutricionais maternos, da quantidade de leite removida pelo lactente e do aumento do fluxo sanguíneo que ocorre com a amamentação (Silva e Vasconcelos, 1988).

### 2.2.1 Ejeção do leite

A ejeção do leite é realizada pela contração das células mioepiteliais após a sucção da papila. A estimulação das terminações nervosas do mamilo produz impulsos aferentes que chegam a neurônios do hipotálamo cujos axônios terminam na hipófise posterior. Sendo assim é lançada na corrente sanguínea a ocitocina de modo pulsátil que interage com receptores específicos nas células mioepiteliais iniciando uma contração coordenada que expelle o leite dos alvéolos para os ductos. A liberação de ocitocina é modulada por vários agentes incluindo o estrogênio e a progesterona (Neville, 2006).

Os níveis de estrogênio no rato são suprimidos pela amamentação após o parto na primeira semana e, em seguida, aumentam gradualmente com a lactação contínua, enquanto que os níveis de progesterona aumentam durante a lactação alcançando o pico em cerca de 10 dias, antes de descer novamente. Assim, cerca de 10-12 dias de lactação o status hormonal esteróide do rato é semelhante ao do animal em meados da gestação, ou seja, aumento de estrogênio e queda dos níveis de progesterona (Burbach, Young *et al.*, 2006).

Algumas espécies, como o rato, amamentam seus jovens em um estado de sonolência, nesses animais a amamentação ocorre frequentemente (a cada 1-2 horas), mas se

violentamente separada de sua ninhada a mãe é capaz de armazenar 12 gramas de leite em suas glândulas mamárias, o que equivale a cerca de 30% da produção diária de leite (Wakerley, 2006).

Fatores relacionados às condições fisiológicas e ambientais são capazes de alterar a ejeção do leite (Gorewit, Wachs *et al.*, 1983). O reflexo ejecto-lácteo pode ser condicionado na mãe por sinais, sons ou odores. O choro de filhotes ou sua presença pode estimular a ejeção do leite, em contrapartida, fatores emocionais como temores ou estresse podem inibir a lactação (Silva e Vasconcelos, 1988; Leavitt, 1995). Muitos animais exibem um repertório de comportamentos complexos que envolvem a limpeza e higiene de seus filhos antes da amamentação. Sem dúvida, isto também proporciona estímulos adicionais (tátil, olfativo e visual) e também evoca o direito de fundo emocional, ou contexto para o desencadeamento da ativação do reflexo ejecto-lácteo (Wakerley, 2006).

Após o desmame dos filhotes, a maioria dos elementos secretores sofrem apoptose e ocorre a remodelação da glândula mamária. O pico de apoptose ocorre entre 3 e 4 dias após a retirada dos filhotes na maioria das cepas de camundongos (Neville, 2006).

### 2.2.2 Eliminação de agentes pelo leite

A eliminação de medicamentos ou de seus metabólitos pelo leite é um assunto de extrema importância. A excreção desses produtos pelo leite pode ser benéfica para os animais, pois esta funciona como uma via de excreção; entretanto, pode causar graves problemas para a prole. Deve ser levada em consideração que o neonato possui baixa capacidade de biotransformar estes agentes pela imaturidade dos seus sistemas enzimáticos (Bernardi, 2002).

As drogas podem chegar ao leite através de qualquer uma das vias existentes para a secreção de componentes do leite, dependendo em grande parte da sua solubilidade lipídica ou sua capacidade de usar os transportadores já presentes na membrana plasmática (Neville, 2006).

Algumas drogas são bem conhecidas por reduzirem a produção de leite, como é o caso do estrogênio. Estrógenos têm uma variedade de efeitos além da sua ação sobre o sistema reprodutor, inclusive efeitos sobre o Sistema Nervoso Central. Portanto químicos com

atividade estrogênica podem afetar numerosas funções do sistema nervoso (Ceccarelli, Fiorenzani *et al.*, 2009).

Devido ao fato de o crescimento do lactente estar diretamente relacionado com a ingestão do leite materno, o uso dessas drogas pode representar risco potencial de déficit ponderal, principalmente durante o puerpério imediato, época mais sensível para a supressão da lactação (Chaves e Lamounier, 2004).

### 2.3 Toxicologia reprodutiva

O ciclo reprodutivo de um indivíduo prolonga-se por boa parte de sua vida, iniciando-se com a produção dos gametas nos pais (ainda no período pré-natal), seguido pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até atingir a maturidade sexual quando os descendentes, já adultos, tornam-se capazes de procriar, dessa forma, diferentes fases da vida reprodutiva podem ser afetadas dependendo de quando o indivíduo foi exposto ao agente tóxico. Assim, a exposição durante a fase de implantação acarreta mais embriofetalidade, do que teratogênese; no período de organogênese tanto pode haver teratogênese, caso as lesões produzidas sejam compatíveis com a vida ou embriofetalidade, se não o forem; no período fetal e neonatal os esboços dos órgãos já estão definidos e a maioria dos tecidos já está formada, nessa ocasião as malformações são menos freqüentes, mas o crescimento e a maturação fisiológica podem ser afetados por agentes tóxicos (Bernardi, 2002).

A toxicologia reprodutiva dedica-se ao estudo de fatores que possam alterar o sistema reprodutor, o desenvolvimento do embrião e feto e o desenvolvimento pós-natal das crias.

Os testes sobre toxicologia reprodutiva foram padronizados através da International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) – que incluiu países da União Européia, Estados Unidos e Japão, que estabeleceu princípios básicos, adotados por tais países para os testes.

Em 2005, a ICH estabeleceu as seguintes etapas para avaliação da toxicidade reprodutiva:

*Estágio 1. Maturação sexual à concepção.* Avaliam-se as funções reprodutivas de machos e fêmeas adultas, o desenvolvimento e maturação de gametas, o comportamento sexual e o processo de fertilização.

*Estágio 2. Concepção à implantação.* São estudados as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento pré-implantação e o período de implantação propriamente dito.

*Estágio 3. Implantação ao fechamento do palato duro.* As funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento embrionário e a formação dos principais órgãos são os objetivos de estudo nesse estágio.

*Estágio 4. Fechamento do palato duro ao final da gestação.* Avaliam-se aqui as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento e crescimento fetal e o desenvolvimento e crescimento dos órgãos fetais.

*Estágio 5. Nascimento ao desmame.* Alvo de estudo: função reprodutora de fêmeas adultas, adaptação neonatal à vida extra-uterina, desenvolvimento pré-desmame e crescimento.

*Estágio 6. Desmame à maturidade sexual.* Investigam-se as ações toxicológicas dos produtos durante o desenvolvimento e crescimento pós-desmame, adaptação das crias à vida independente até atingir a maturidade sexual. Aqui se investigam também a fisiologia e indícios de toxicidade materna.

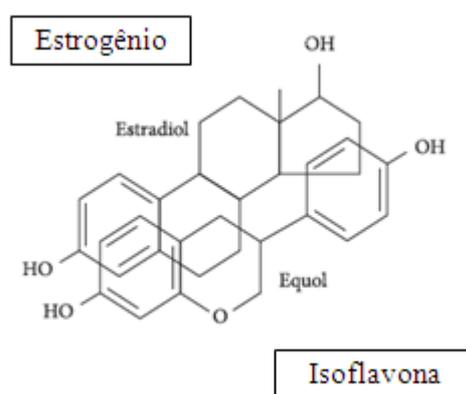
Dessa forma, para a avaliação do desenvolvimento pós natal das crias, são adequados os estágios cinco e seis.

## 2.4 Isoflavonas

O uso de ervas medicinais tem crescido nos últimos anos (Eisenberg, Davis *et al.*, 1998), principalmente por mulheres que as usam para os mais variados propósitos, como dificuldades menstruais, sintomas da menopausa, alterações do humor e para tratamento de

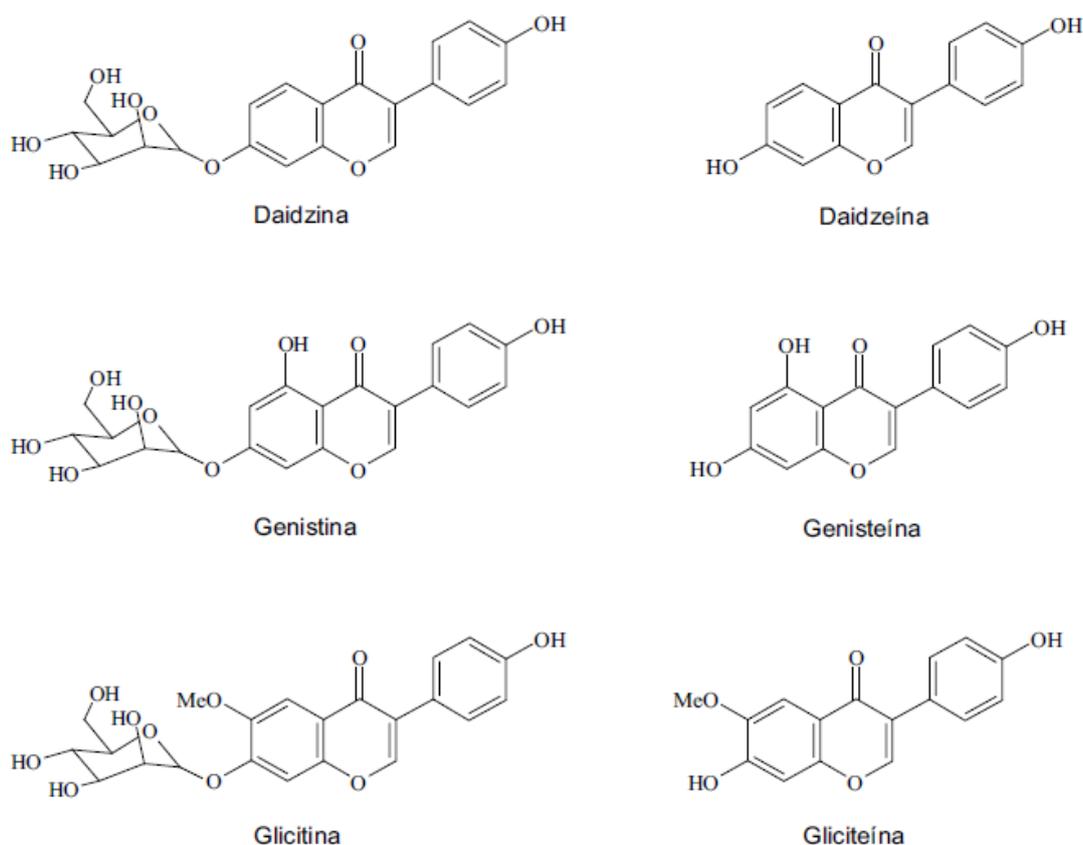
doenças ósseas (Tesch, 2003). Muitos dos efeitos obtidos estão relacionados aos flavonóides presentes na composição dessas ervas, que possuem ações anticarcinogênica, antiviral, antioxidante e antiinflamatória (Harbone e Williams, 2000; Havsteen, 2002).

Os fitoestrogênios são compostos não esteróides de ocorrência natural encontrados em plantas que têm sua estrutura fenólica parecida com o estrogênio (Figura 1) o que faz com que eles possam se ligar aos receptores de estrógeno e competir com os hormônios endógenos, exercendo uma ação agonista ou antagonista (Ibarreta, Daxenberger *et al.*, 2001; Clapauch, Meireles *et al.*, 2002), porém mais fraca que o estrogênio (Bawa, 2010). O anel fenólico A é o aspecto mais importante para a ligação seletiva de ambos os receptores ( $\alpha$  e  $\beta$ ), a maior parte das substituições nos anéis alquila do anel A compromete a ligação, embora possam ser toleradas substituições nos anéis C ou D (Loose e Stancel, 2010).



**Figura 1** - Estruturas químicas do estradiol e do equol. Observe a similaridade entre o estradiol e a isoflavona. Fonte: adaptado de (Frota, Matias *et al.*, 2010).

As principais classes desses compostos são as isoflavonas, lignanas e coumestanos (Adlercreutz, 2002; Cornwell, Cohick *et al.*, 2004; Moon, Wang *et al.*, 2006). As isoflavonas são os fitoestrogênios mais comuns, sendo encontradas em abundância nos grãos de soja (*Glycine max* L.) e seus derivados. Daidzeína, genisteína e gliciteína estão presentes em maior proporção na soja, ocorrendo também na forma de glicosídeos, isto é ligadas à uma molécula de açúcar, que são denominados de daidzina, genistina e glicitina (Figura 2) (Ferrari e Demiate, 2001; Duncan, Willian *et al.*, 2003). Das isoflavonas, genisteína e daidzeína são pensados para exercer a atividade hormonal estrogênica mais potente e, portanto, a maioria da atenção na pesquisa tem sido direcionada para essas moléculas (Lephart, West *et al.*, 2002).



**Figura 2** - Estruturas químicas das isoflavonas em suas formas glicosídicas e agliconas. Fonte: (César, Braga *et al.*, 2007)

A maioria das isoflavonas se encontram ligadas à moléculas de açúcar sendo assim inativas (Brown e Setchell 2001), para ativação da molécula é necessária a passagem pelo trato gastrointestinal para que esse açúcar seja clivado e essa molécula se torne ativa; a daidzeína ainda pode ser metabolizada a equol, uma molécula que tem sido amplamente estudada por possuir atividade estrogênica, tendo afinidade pelos receptores  $\alpha$  e  $\beta$ . Equol é superior a todas outras isoflavonas na sua atividade oxidante, uma vez formado ele é relativamente estável. Porém ele não é produzido por todos os adultos saudáveis, estima-se que somente 30-50% da população produzam equol (Matulka, Matsuura *et al.*, 2009) e recentes estudos demonstram que as respostas clínicas máximas para dietas ricas em proteínas de soja são alcançadas por indivíduos bons produtores de equol (Setchell, Brown *et al.*, 2002).

Existe considerável interesse científico no papel de fitoestrogênios em vários aspectos da saúde humana. A atenção tem sido voltada principalmente para tipos de câncer hormônio dependentes (como o câncer de mama e de próstata), doenças cardiovasculares e osteoporose e sintomas relacionados à menopausa (Duncan, Willian *et al.*, 2003).

Quando utilizadas para prevenção de perda óssea, as isoflavonas isoladas mostram efeitos distintos, não podendo ser assim consideradas como uma única entidade. Em ratas ooforectomizadas tratadas com diferentes fitoestrogenos isolados somente a daidzeína estimulou o crescimento e a diferenciação dos tecidos ósseos de forma tão eficaz quanto o estrogênio ou o raloxifeno, além de ter exercido ação sobre o desaparecimento de adipócitos demonstrando uma ação no metabolismo da medula óssea, sugerindo assim ser mais eficaz na reversão de mudanças da menopausa (Somjen, Katzburg *et al.*, 2008).

#### 2.4.1 Efeitos na reprodução

Na literatura há vários estudos das isoflavonas, que incluem interferência no sistema imunológico, alterações na função tireoideana, redução de absorção de vitaminas, produção de danos no DNA, entre outros (Clapauch, Meireles *et al.*, 2002; Hollenbach, 2008), porém a maioria dos estudos é sobre efeitos na reprodução.

Na reprodução as isoflavonas têm sido amplamente estudadas, havendo um grande espectro de ação. Liu, Zhang *et al.*, 2007 demonstraram que neonatos aleitados por mães expostas à isoflavonas, apresentaram alterações no sistema reprodutor das crias fêmeas, havendo um grande aumento das concentrações séricas de estrogênio resultando em aumento do peso de órgãos como útero e ovário e ao mesmo tempo diminuindo a concentração sérica de progesterona.

A genisteína é o isoflavonóide mais estudado e que possui uma maior atividade estrogênica. Foi demonstrado que a genisteína é transferida através do leite materno para suas crias (Doerge, Twaddle *et al.*, 2006) e que quando administrada durante gerações consecutivas causa hiperplasia da glândula mamária em ratos do sexo masculino, sendo este fato um dos indicadores mais sensíveis da regulação endócrina de estrogênio (Latendresse, Bucci *et al.*, 2009), embora seja observado também com outras substâncias conhecidas por seu alto grau de disrupção endócrina como o bisphenol A (Vandenberg, Maffini *et al.*, 2008).

A daidzeína mostrou ter efeitos negativos na implantação de blastocistos de ratos quando administrada por via subcutânea. Esses dados mostram uma desregulação no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal uma vez que essa isoflavona foi capaz de abaixar os níveis séricos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRh), progesterona e gonadotrofinas

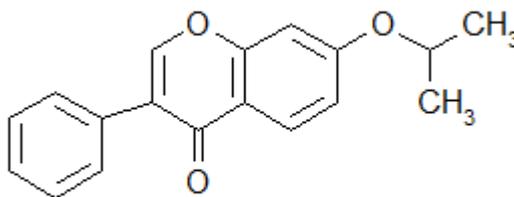
(Hormônio Folículo Estimulante, FSH e o Hormônio Luteinizante, LH), ao mesmo tempo que aumentou níveis de beta endorfina um inibidor do GnRh (Wu, Yang *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 Efeitos no comportamento

Devido ao alto consumo de dietas à base de soja, uma atenção maior tem sido dada aos possíveis efeitos comportamentais que esses produtos podem exercer. Já foram descritos vários efeitos em animais tratados com dieta enriquecida com fitoestrogenos, efeitos estes que permanecem na idade adulta e muitas vezes são irreversíveis. Lephart *et al.* (2002) demonstraram que as isoflavonas e seus metabólitos são capazes de alterar significativamente regiões cerebrais relacionadas ao dimorfismo sexual, aprendizagem, ansiedade e memória. Com isso os autores ressaltam a importância que deve ser dada aos efeitos de substâncias que mimetizam e/ou antagonizam os efeitos dos estrogênios no cérebro e suas possíveis conseqüências como por exemplo o mal de Alzheimer, principalmente em mulheres.

#### 2.5 Ipriflavona

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona) (Figura 3) é um derivado sintético da daidzeína, comercializado em alguns países, com a finalidade de aumentar a densidade e prevenir a perda óssea (Yamazaki, 1986; Head, 1999; Chambô Filho, Chambô *et al.*, 2000). Sua absorção se dá pelo intestino delgado, fígado e rins; é extensivamente metabolizada por oxidação no fígado, produzindo sete metabólitos diferentes (Moon, Kim *et al.*, 2007). É excretada por via biliar, fecal e urinária (Yoshida, Tsukamoto *et al.*, 1985; Levai, Vargay *et al.*, 1989). Seu nível sérico máximo em ratos é atingido em 1,5h e sua meia-vida é de 5,8h. 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, Tsukamoto *et al.*, 1985).



**Figura 3** – Estrutura química da ipriflavona. Fonte: adaptado de (Lipinski e Bushman, 2010).

Os medicamentos validados pela ANVISA indicam a posologia de 600 mg por dia de ipriflavona, sendo este fármaco comercializado sob a forma de cápsulas, nas concentrações de 200 e 300 mg, sendo administrado, respectivamente, de 8 em 8 e de 12 em 12 horas (ANVISA, 2008).

Os metabólitos da ipriflavona possuem efeitos inibitórios sobre as CYPs 1A2, 2C8 e 2C19 (enzimas isomorfas do citocromo P450) (Moon, Kim *et al.*, 2007), aumentam os níveis plasmáticos de teofilina, e também atuam inibindo competitivamente com a isoenzima do citocromo P450, CYP2C9, responsável pela catalisação de outros fármacos, como a warfarina (Scott e Elmer, 2002). Essa inibição de enzimas do citocromo P450 pode interferir com a síntese de hormônios esteróides, já que a enzima CYP19 aromatase catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos sendo responsável pelo balanço homeostático entre hormônios femininos e masculinos (Simpson, Clyne *et al.*, 2002) podendo assim causar prejuízos no desenvolvimento perinatal, pois na ocasião do nascimento os animais não possuem todos os sistemas fisiológicos maduros (Pohl, Smith-Simon *et al.*, 1998).

Já foi demonstrado que a ipriflavona possui um efeito apoptótico (Tani, Matsuda *et al.*, 2004), o que também poderia interferir com o desenvolvimento da prole, uma vez que no sistema nervoso em amadurecimento há a proteção da apoptose em algumas áreas e a indução de apoptose em outras (McCarthy, 2008).

Estudos dos efeitos na reprodução demonstram que a ipriflavona é capaz de inibir a via de sinalização Hedgehog, via esta que no período de desenvolvimento embrionário, se perturbada é capaz de causar defeitos congênitos graves (Lipinski e Bushman, 2010). Em estudos realizados no Centro de Biologia da Reprodução não foram encontrados defeitos congênitos na prole onde mães receberam a ipriflavona por via oral durante os períodos de

organogênese e fetogênese, porém assim como a daidzeína (Wu, Yang *et al.*, 2005), a ipriflavona mostrou também ter efeitos negativos na implantação de blastocistos de ratas quando administrada por via oral (dados não publicados).

Os laboratórios farmacêuticos responsáveis pela comercialização da ipriflavona não indicam o uso da ipriflavona no período da lactação, visto que essa substância pode passar pelo leite materno. Porém não foram encontrados estudos que comprovassem esse fato.

Visto que substâncias como as isoflavonas são capazes de passar para o leite materno e a ipriflavona possui as propriedades apresentadas acima se torna necessário o estudo do efeito dessa substância na prole quando administrada às suas mães durante o período de lactogênese.

### **3. HIPÓTESE**

A administração da suspensão aquosa de ipriflavona a ratas lactantes altera o desenvolvimento físico e reflexológico da prole

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar o desenvolvimento físico e neuromotor de crias de ratas lactando, que receberam extrato aquoso de ipriflavona.

### 4.2 Específicos

- Observar possíveis efeitos da suspensão aquosa da ipriflavona no período de lactação
- Observar manifestações de sinais clínicos de toxicidade na mãe
- Avaliar o aparecimento dos sinais físicos de desenvolvimento pós-natal
- Avaliar o crescimento da ninhada
- Determinar o período de aparecimento dos reflexos neuromotores

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 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, lote número 061005 (DCB: 03913.01-5; CAS: 35212-22-7; código: 1.1131-0; fração nº 534068 28/12/06) e foi gentilmente cedida pela professora doutora Tânia Toledo da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG, Brasil.

### 5.2 Modelo Experimental

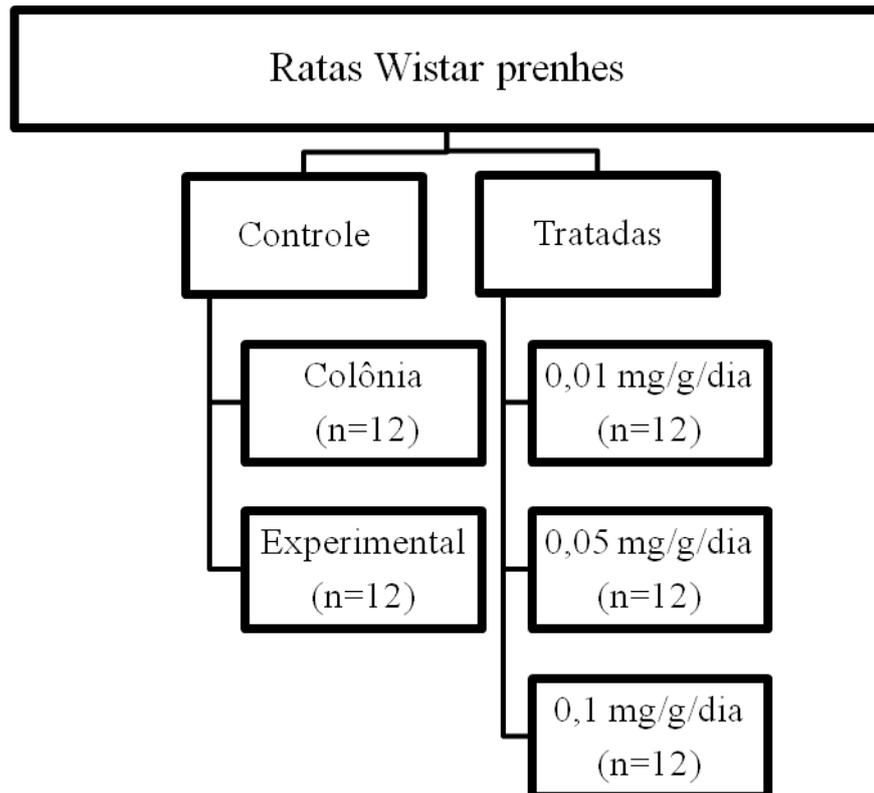
Ratas Wistar nulíparas (n=60), com idade compreendida entre 90 e 120 dias, provenientes da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram acasaladas com machos de fertilidade comprovada, na proporção 2:1, na noite em que estavam na fase de proestro e na manhã seguinte, após a separação do macho, verificou-se o acasalamento através da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal (dia 1 pós inseminação). No 15<sup>o</sup> dia de prenhez os animais foram separados em gaiolas individuais.

### 5.3 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, localizados em alojamentos com sistema de iluminação artificial em fotoperíodo de 12h claro/ 12h escuro, temperatura de 22°C ± 2°C e umidade relativa do ar entre 40-60%.

#### 5.4 Organização dos grupos experimentais

No 20<sup>o</sup> dia de prenhez os animais foram distribuídos entre cinco grupos experimentais, como ilustrado abaixo (Figura. 4). A composição dos grupos foi feita de forma aleatória através de sorteio.



**Figura. 4** – Esquema ilustrativo da distribuição dos animais entre os grupos experimentais

O grupo controle da colônia não teve nenhum tipo de manipulação (este grupo foi utilizado para se estudar os possíveis efeitos causados pelo estresse do procedimento de gavagem) (Schumarz, Górnjak *et al.*, 2003), o grupo controle experimental recebeu 1 ml de água destilada via intragástrica duas vezes ao dia (7h e 19h) do 2<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de lactação. Já os grupos tratados 1, 2 e 3 receberam suspensão aquosa de ipriflavona nas doses 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia (equivalente a dose terapêutica, 5 vezes e 10 vezes a dose indicada), respectivamente, via intragástrica duas vezes ao dia (7h e 19h) durante o mesmo período. As doses foram baseadas em estudos prévios realizados no Centro de Biologia da Reprodução.

A ipriflavona em pó foi pesada de acordo com a dose utilizada para cada grupo e diluída em 1 ml de água destilada.

### 5.5 Avaliação de toxicidade materna

A toxicidade materna foi avaliada através do peso corporal, hiper ou hipoatividade, piloereção, estereotipia, cromodacriorréia, sangramento vaginal, diarreia e morte (Hood e Miller, 2006). 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). Esses comportamentos foram observados por uma hora antes do procedimento de gavagem e uma hora após o procedimento.

### 5.6 Avaliação do desenvolvimento neonatal das crias

Vinte e quatro horas após o nascimento fez-se a pesagem individual e a observação do estado físico de cada filhote, só foram usados aqueles em perfeita condição física. 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.

Os seguintes dados foram anotados diariamente para a avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico das crias:

#### **Desenvolvimento físico:**

O desenvolvimento físico foi avaliado pelo peso corporal e sinais indicadores de desenvolvimento físico (SIDF).

As crias vivas e mortas foram contadas e as primeiras foram pesadas vinte e quatro horas após o nascimento, e no 4<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias após o parto (Bailey, Wise *et al.*,

2009). Como sinais indicadores do desenvolvimento físico das crias 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, Górnaiak *et al.*, 2003).

Para observação do lanugo foi utilizada lupa de mão. O aparecimento dos pêlos foi considerado quando o animal estivesse todo coberto e na cor branca. A erupção dos dentes incisivos foi feita com a ajuda de um lápis atritando a gengiva. A abertura vaginal deveria ser perfeitamente discernível. A descida dos testículos foi determinada quando os dois testículos foram palpáveis no escroto.

#### **Desenvolvimento reflexológico:**

Foram feitos os seguintes testes: preensão palmar, resposta postural, esquiva ao abismo, orientação e geotaxia negativa. Os testes foram feitos diariamente após o procedimento de gavagem, até que todos os reflexos aparecessem, tendo duração de 15 segundos cada (Silva, 1991).

A)- Teste de preensão palmar: é observado o dia em que a preensão aparece e desaparece; é o único sinal que desaparece ao longo do tempo. Um objeto pontiagudo, no caso um clips, é colocado na pata dianteira do animal e se o observa a preensão (Figuras 5 e 6).



**Figura 5** – Teste de preensão palmar. Observe a ausência de reflexo. (Arquivo pessoal)



**Figura 6** – Teste de preensão palmar. Observe a presença de reflexo. (Arquivo pessoal)

B)- Teste de resposta postural: o filhote é colocado sobre uma mesa em decúbito dorsal e sua resposta é se voltar a posição de decúbito ventral (Figuras 7 e 8).



**Figura 7** – Teste de resposta postural. Observe a ausência do reflexo. (Arquivo pessoal)



**Figura 8** – Teste de resposta postural. Observe a presença de reflexo. (Arquivo pessoal)

C)- Teste de esquiva ao abismo: é observado o deslocamento do filhote em direção oposta à borda, uma vez que ele é colocado na borda de uma mesa com as patas dianteiras voltadas para fora (Figuras 9 e 10).



**Figura 9** – Teste de esquiva ao abismo. Observe a ausência de reflexo. (Arquivo pessoal)



**Figura 10** – Teste de esquiva ao abismo. Observe a presença de reflexo. (Arquivo pessoal)

D)- Teste de orientação: o filhote é preso pela cauda com a cabeça tocando a borda da mesa, e tal forma que as vibrissas toquem a superfície vertical. A resposta consiste em elevar a cabeça e estender as patas dianteiras em direção à mesa (Figura 11).



**Figura 11** – Teste de orientação. (Arquivo pessoal)

E)- Teste de geotaxia negativa: o animal é colocado sobre uma plataforma inclinada posicionado com a cabeça voltada para baixo, observa-se o animal dar uma volta de 180° (Figuras 12 e 13).



**Figura 12** – Teste de geotaxia negativa. Observe a ausência de reflexo. (Arquivo pessoal)



**Figura 13** – Teste de geotaxia negativa. Observe a presença de reflexo. (Arquivo pessoal)

Para a observação das variáveis de desenvolvimento físico e reflexológico, foi usada luva, mantida em contato previamente com a maravalha da gaiola materna. Os filhotes foram manuseados com delicadeza e devolvidos a gaiola, observando-se o seu recolhimento pela mãe.

## 5.7 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 ou Qui quadrado. O nível de significância dos testes foi de  $\alpha = 0,05$ .

### 5.8 Aprovação do Comitê de Ética

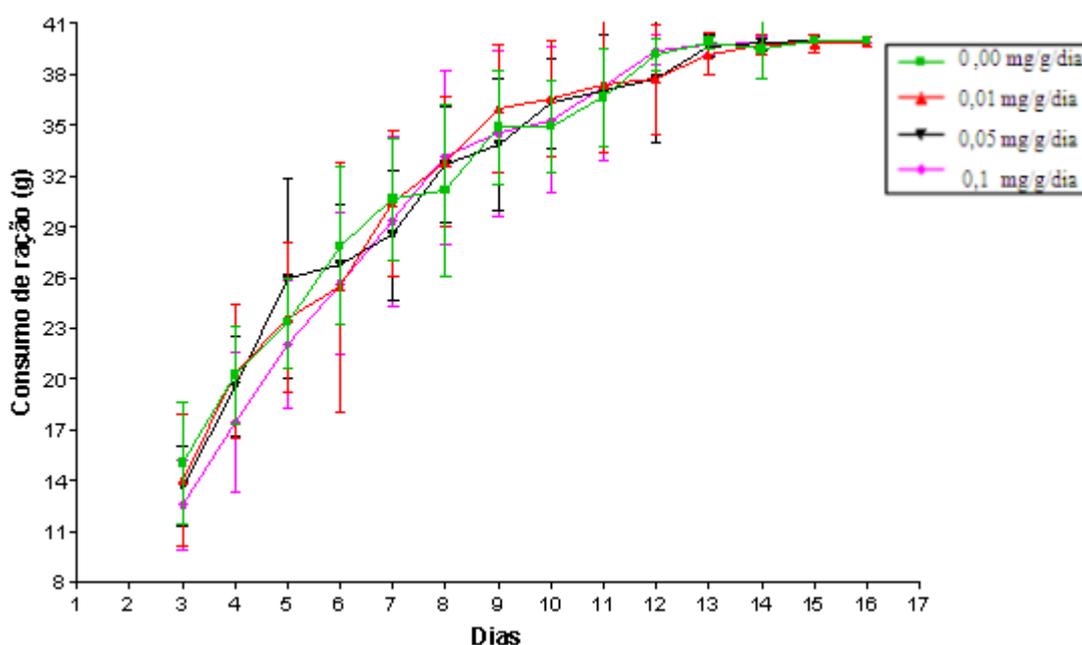
A metodologia deste trabalho foi aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal (protocolo número 029/2009-CEEA, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil).

## 6. RESULTADOS

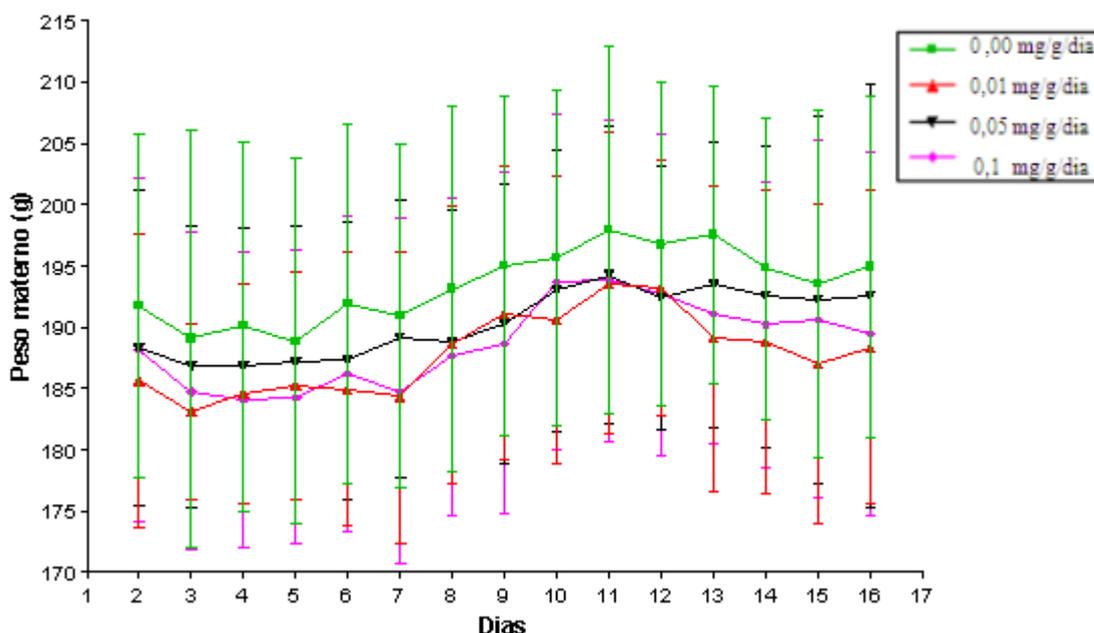
### 6.1 Avaliação materna

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 - piloereção, hipo ou hipermotilidade no interior da gaiola, estereotípias, cromodacriorréia, diarreia, perdas sanguíneas vaginais e mortes – em nenhum dos grupos estudados. Também não foram observadas diferenças significativas do consumo alimentar ou peso materno entre os grupos controle da colônia e o controle experimental (dados não mostrados). Sendo assim foi feita a comparação do grupo controle experimental e grupos tratados onde não se observou diferenças significativas entre os grupos no consumo de ração (Figura 14) ou peso materno (Figura 15).



**Figura 14** - Consumo estimado de ração por ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia. Os resultados mostram o consumo médio diário do 2<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de lactação. N = 48.  $p > 0,05$ .



**Figura 15** - Peso corporal materno de ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero, 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia. Os resultados mostram o peso médio do 2<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de lactação. N = 48.  $p > 0,05$ .

## 6.2 Avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico da prole

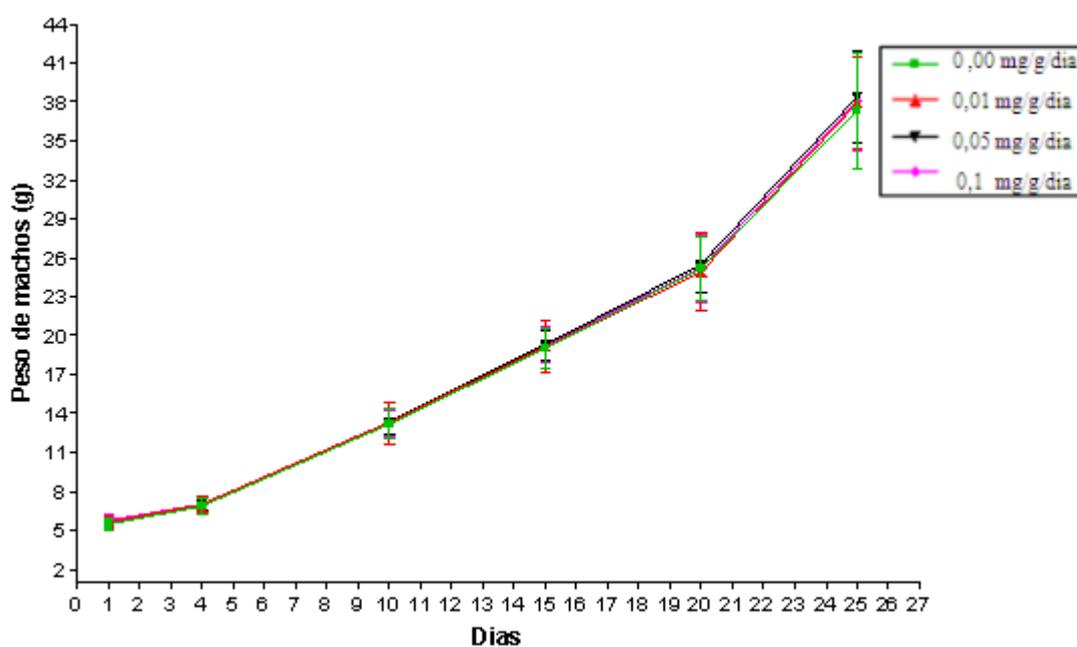
A tabela 1 mostra o número de mortes ocorridas durante o período de observação da prole.

**Tab. 1** – Número de mortes ocorridas em crias de ratas Wistar lactantes tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero, 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia.

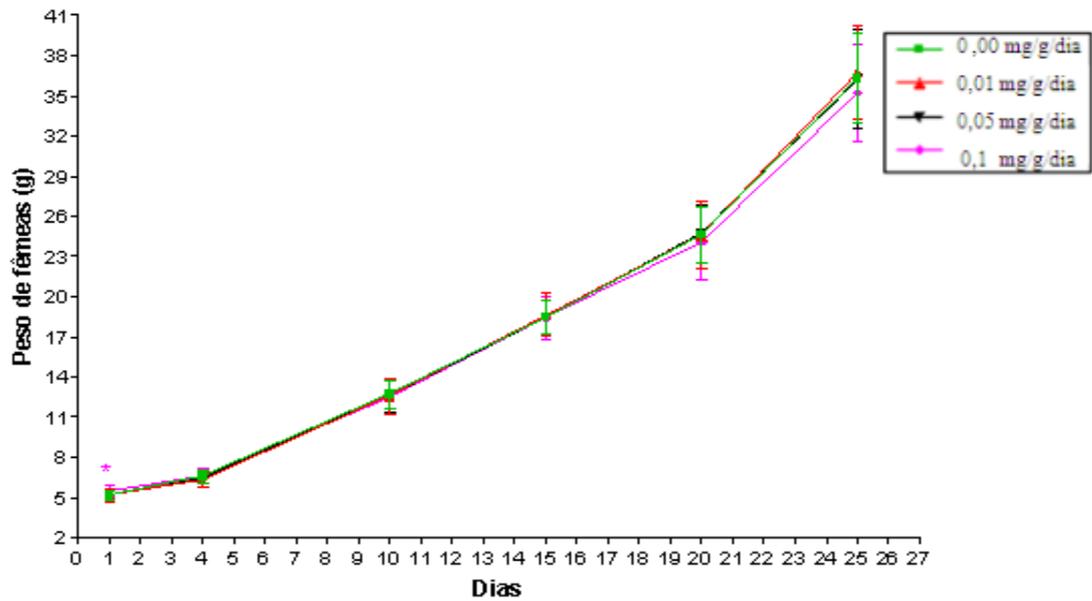
VARIÁVEIS	Sexo	Ipriflavona (mg/g/dia)			
		0	0,01	0,05	0,1
Mortes até o 5 <sup>o</sup> dia de vida	M	0	0	1	0
	F	0	0	0	0
Mortes do 6 <sup>o</sup> ao 15 <sup>o</sup> dia de vida	M	1	0	0	0
	F	0	0	0	0
Mortes a partir do 16 <sup>o</sup> dia de vida	M	1	2	0	0
	F	0	0	0	0
Total		2	2	1	0

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

Os dados referentes ao peso dos filhotes não mostraram diferença significativa entre os grupos controles colônia e experimental (dados não mostrados). A Figura 16 ilustra os dados referentes ao peso de todos os filhotes do sexo masculino, não havendo diferença significativa entre o grupo controle experimental e os grupos tratados. A Figura 17 ilustra os dados referentes ao peso de todos os filhotes do sexo feminino, onde somente nas 24 horas após o nascimento foram encontradas diferenças significativas entre grupo controle experimental e o grupo que recebeu a maior dose, porém como esse resultado foi observado antes do início do tratamento, não foi influenciado pela administração da ipriflavona ( $p < 0,01$ ).



**Figura 16** - Peso corporal de crias do sexo masculino, desde as primeiras 24 horas após o nascimento (dia 1) ao 25<sup>o</sup> dia de vida, provenientes de mães tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia. n = 48.  $p > 0,05$ .



**Figura 17** - Peso corporal de crias do sexo feminino, desde as primeiras 24 horas após o nascimento (dia 1) ao 25<sup>o</sup> dia de vida, provenientes de mães tratadas com suspensão aquosa de ipriflavona nas concentrações zero; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/g/dia. n = 48. \* p < 0,01

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

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

Variável	Sexo	Ipriflavona (mg/g/dia)			
		0 n = 46 (M); 48 (F)	0,01 n = 46 (M); 48 (F)	0,05 n = 47 (M); 48 (F)	0,01 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

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

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

Variável	Sexo	Ipriflavona (mg/g/dia)			
		0 n = 46 (M); 48 (F)	0,01 n = 46 (M); 48 (F)	0,05 n = 47 (M); 48 (F)	0,1 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

## 7- DISCUSSÃO

O comportamento materno em mamíferos é responsável por assegurar a sobrevivência da prole (Marchlewska-Koj, Kapusta *et al.*, 1999) e promover um 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 e File, 1996). Além disso, tanto o bem estar físico quanto o estado de saúde maternos são essenciais para o desenvolvimento físico da prole (Chahoud, Ligensa *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 (Holson, Nemeč *et al.*, 2006). 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 um evento que provê a cria de 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 e 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, Yang *et al.*, 2005); o que também poderia modificar a produção do leite materno. Embora nesse estudo não se tenha testado a passagem da ipriflavona para o leite materno, existe a possibilidade de que tal ocorresse uma vez que vários autores relataram efeito das isoflavonas na prole, através da ingestão de leite (Doerge, Twaddle *et al.*, 2006; Liu, Zhang *et al.*, 2007).

Estudos prévios com a genisteína indicam menor ganho de peso em neonatos expostos à isoflavona (Delclos, Bucci *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 massa corporal se devem ao consumo de leite materno (Doerge, Twaddle *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, Ghabrial *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, Nielsen *et al.*, 2000). Consequentemente, 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 (Doerge, Churchwell *et al.*, 2001). 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.

Em conclusão, a suspensão aquosa de ipriflavona, não apresentou indícios de toxicidade materna nem de alterações no desenvolvimento físico e reflexológico da prole.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDER, S. Behavioral teratology. In: PRESS, R. (Ed.). **Application of behavioral pharmacology in toxicology**. New York, p.57-66, 1983.

ANDERSEN, H. R.; NIELSEN, J. B.; GRANDJEAN, P. Toxicology evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. **Toxicology**, v. 144, p. 121-127, 2000.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em:  
< [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/628\\_01re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/628_01re.htm) >. Acesso em: maio de 2008.

BAILEY, G. P. et al. Pre- and postnatal developmental toxicity study design for pharmaceuticals. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 86, n. 6, p. 437-445, Dez. 2009.

BARNETT, S. A.; BURN, J. Maternal and infant behavior. In: FEBIGER, L. E. (Ed.). **Reproduction and breeding techniques for laboratory animal**. Philadelphia, p.177-191, 1970.

BAWA, S. The significance of soy protein and soy bioactive compounds in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. **J Osteoporos**, v. 2010, p. 891058, Jan. 2010.

BERNARDI, M. M. Exposição a medicamentos durante o período perinatal. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária** 3 ed. Rio de Janeiro, p.691-699, 2002.

BONILLA, C. A. Isoflavonas en ginecología, terapia no convencional. **Rev Colomb Obstet Ginecol**, v. 55, n. 3, p. 209-217, 2004.

BROWN, N. M.; SETCHELL, K. D. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. **Lab Invest**, v. 81, n. 5, p. 735-47, Mai. 2001.

BROWN, R. E. Hormônios e comportamento parental. In: ETOLOGIA, S. B. D. (Ed.). **Comportamento materno em mamíferos: bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos**. São Paulo, p.53-99, 1998.

BURBACH, J. P. H.; YOUNG, L. J.; RUSSELL, J. A. Oxytocin: Synthesis, secretion, and reproductive functions. In: NEIL, J., **Physiology of reproduction**, cap. 58, p.3055-3128, 2006.

CASTRO, V. L. S. S. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 21, n. 3, p. 469-497, Set-Dez. 2004.

CATHELINE, G. et al. Parturition in the rat: a physiological pain model. **Anesthesiology**, v. 104, n. 6, p. 1257-65, Jun. 2006.

CECCARELLI, I. et al. Perinatal exposure to xenoestrogens affects pain in adult female rats. **Neurotoxicol Teratol**, v. 31, n. 4, p. 203-9, Jul-Aug. 2009.

CÉSAR, I. C. et al. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 616-625, Out-Dez. 2007.

CHAMBÔ FILHO, A.; CHAMBÔ, D.; CHAMBÔ, F. A. A soja como alimento funcional em ginecologia. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 15, n. 2, p. 326-329, 2000.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiol Behav**, v. 79, p. 359-371, Abr. 2003.

CHAHOU, I. et al. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reprod Toxicol**, v. 13, p. 375-381, 1999.

CHAVES, R. G.; LAMOUNIER, J. A. Uso de medicamentos durante a lactação. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 189-198, 2004.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 6, p. 679-695, Dez. 2002.

CORNWELL, T.; COHICK, W.; RASKIN, I. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 995-1016, 2004.

DECLOS, K. B. et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. **Reprod Toxicol**, v. 15, n.6, p.647-663, 2001.

DOERGE, D. R. et al. Lactational transfer of the soy isoflavone, genistein, in Sprague-Dawley rats consuming dietary genistein. **Reprod Toxicol**, v. 21, n. 3, p. 307-12, Abr. 2006.

DOERGE, D. R. et al. Placental transfer of the soy isoflavone, genistein, following oral administration to Sprague-Dawley rats. **Reprod Toxicol**, v. 15, n.2, p.105-110, 2001.

DUNCAN, A. M.; WILLIAN, R. P.; MINDY, S. K. Phyto-oestrogens. **Best Practice Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 253-271, 2003.

EISENBERG, D. M. et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA**, v. 280, n. 18, p. 1569-75, Nov. 1998.

FERRARI, A. S.; DEMIATE, I. M. Isoflavonas de soja - uma breve revisão. **Biol Health Science**, v. 7, n. 1, p. 39-46, 2001.

FROTA, K. M. G.; MATIAS, A. C. G.; AREAS, J. A. G. Influence of food components on lipid metabolism: scenarios and perspective on the control and prevention of dyslipemias. **Ciê. Tecnol. Aliment. (on line)**, v. 30, n. 1, p. 7-14, 2010.

GARRIDO, A.; DE LA MAZA, M. P.; VALLADARES, L. Dietary phytoestrogen and its potential benefits in adult human health. **Rev Med Chil**, v. 131, n. 11, p. 1321-1328, 2003.

GOFFIN, V. et al. Prolactin: the new biology of and old hormone. **Ann. Rev. Physiol**, v. 64, p. 47-67, 2002.

GOREWIT, R. C. et al. Current concepts on the role of oxytocin in milk ejection. **J. Dairy. Sci.**, v. 66, p. 236-250, 1983.

GOW, P. J. et al. Neonatal hepatic drug elimination. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, p. 3-15, 2001.

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

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov-Dez. 2002.

HEAD, K. A. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. **Altern Med Rev**, v. 4, n. 1, p. 10-22, Fev. 1999.

HOLLENBACH, C. B. **Estudo da toxicidade reprodutiva de duas formulações fitoterápicas comerciais contendo soja (*Glycine max.* (L.) Merr) em ratos Wistar.** Dissertação de mestrado Programa de pós graduação em ciências veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 132p, 2008.

HOOD, R. D.; MILLER, D. B. Maternally mediated effects on development. In: HOOD, R. D. (Ed.). **Developmental and reproductive toxicology: a practical approach**. 2nd. London: Taylor & Francis, p.93–124, 2006.

IBARRETA, D.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H. H. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavina**, v. 109, n. 3, p. 161-184, mar. 2001.

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.

KENDRICK, K. M. Oxytocin, motherhood and bonding. **Exp Physiol**, v. 85 Spec No, p. 111S-124S, Mar. 2000.

KRISTAL, M. B. The biopsychology of maternal behavior in nonhuman mammals. **ILAR J**, v. 50, n. 1, p. 51-63, 2009.

LATENDRESSE, J. R. et al. 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**, v. 28, n. 3, p. 342-53, Nov. 2009.

LEAVITT, W. W. The female reproductive system during pregnancy, parturition and lactation. In: (Ed.). **Reproductive toxicology**, 1995. p.45-60.

- LEPHART, E. D. et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, n. 1, p. 5-16, Jan-Fev. 2002.
- LEVAI, F. et al. [Pharmacokinetics and metabolism of ipriflavone in humans. II]. **Acta Pharm Hung**, v. 59 Suppl 1, p. 38-42, 1989.
- LIPINSKI, R. J.; BUSHMAN, W. Identification of Hedgehog signaling inhibitors with relevant human exposure by small molecule screening. **Toxicol in vitro**, v. 24, n. 5, p. 1404-9, Ago. 2010.
- LIU, Z. et al. Effects of lactational exposure to soy isoflavones on reproductive system in neonatal female rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 102, p. 317-324, 2007.
- LOOSE, D. S.; STANCEL, G. M. Estrogênios e Progestogênios In: BRUTON, L. L. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**, cap. 57, p.1391-1419, 2010.
- MARCHLEWSKA-KOJ, A.; KAPUSTA, J.; OLEJNICZAK, P. Ultrasonic response of CBA newborn mice to bedding odour. **Behaviour**, v. 136, n. 3, p. 269-278, 1999.
- MATULKA, R. A. et al. Developmental and Reproductive Effects of SE5-OH: An Equol-Rich Soy-Based Ingredient. **J Toxicol**, v. 2009, p. 307618, 2009.
- MCCARTHY, M. M. Estradiol and the developing brain. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 91-124, Jan. 2008.
- MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 1161-92, 2001.
- MOON, Y. et al. Characterization of cytochrome P450s mediating ipriflavone metabolism in human liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 37, n. 3, p. 246-59, Mar. 2007.
- MOON, Y.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol in vitro**, v. 20, n. 2, p. 187-210, 2006.
- MOTTA, S. et al. Administração de polvilho de lobeira a ratas lactando: comportamento materno e desenvolvimento neuromotor das crias. **Rev Bras Zootecias**, v. 4, n. 2, p. 255-268, Dez. 2002.
- NEVILLE, M. C. Lactation and its hormonal control. In: NEILL, J. D. (Ed.). **Physiology of reproduction** 3º ed., cap. 57, p.2993-3054, 2006.
- NOGUEIRA, G. P. Farmacologia do eixo hipotálamo-hipófise. In: SPINOSA, H. S. *et al.* **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro, cap. 29, p.300-318, 1999.
- PANKSEPP, J.; NELSON, E.; SIVIY, S. Brain opioids and mother-infant social motivation. **Acta Paediatr Suppl**, v. 397, p. 40-6, Jun. 1994.

POHL, H.; SMITH-SIMON, C.; HICKS, H. Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: developmental effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 55-60, 1998.

POINDRON, P. Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. **Reprod Nutr Dev**, v. 45, p. 341-351, 2005.

POPESKI, N.; WOODSIDE, B. Central nitric oxide synthase inhibition disrupts maternal behavior in the rat. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 6, p. 1305-16, Dez. 2004.

SCÁRDULA, S. S.; BASTOS, R. The aggression in maternal behaviour: physiological aspects. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 2, n. 3, p. 189-198, 2009.

SCHUMARZ, A. *et al.* Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. **Neurotoxicol Teratol**, v. 25, p. 615-626, 2003.

SCOTT, G. N.; ELMER, G. W. Update on natural product--drug interactions. **Am J Health Syst Pharm**, v. 59, n. 4, p. 339-47, Fev. 2002.

SETCHELL, K. D.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **J Nutr**, v. 132, n. 12, p. 3577-84, Dez. 2002.

SILVA, S. Z. C.; VASCONCELOS, A. C. A lactação. In: BREDAN, J. N. **O uso de drogas na gravidez e na lactação**. Rio de Janeiro, cap. 2, p.14-23, 1988.

SILVA, V. A. Métodos experimentais utilizados na avaliação de efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento. In: RABELO-GAY, M. N. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese (métodos e critérios de avaliação)**. São Paulo, p.219-241, 1991.

SIMPSON, E. R. *et al.* Aromatase - A brief overview. **Ann Rev Physiol**, v. 64, p. 93-127, 2002.

SODERSTEN, P.; ENEROTH, P. Effects of exposure to pups on maternal behaviour, sexual behaviour and serum prolactin concentrations in male rats. **J Endocrinol**, v. 102, n. 1, p. 115-9, Jul. 1984.

SOMJEN, D. *et al.* Daidzein but not other phytoestrogens preserves bone architecture in ovariectomized female rats in vivo. **J Cell Biochem**, v. 103, n. 6, p. 1826-32, Abr. 2008.

SOUZA, A. Z.; HEGG, R. Fisiologia da lactação. In: HALBE, H. W. **Tratado de ginecologia**. 2º ed., v.2, cap. 37, p.319-324, 1993.

SPEAR, L. P.; FILE, S. E. Methodological considerations in neurobehavioral teratology. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 55, n. 4, p. 455-457, 1996.

STERN, J. M.; AZZARA, A. V. Thermal control of mother-young contact revisited: hyperthermic rats nurse normally. **Physiol Behav**, v. 77, n. 1, p. 11-18, Set. 2002.

TANI, S.; MATSUDA, K.; TANAKA, T. Induction of apoptosis in cultured rat gastric epithelial cells by ipriflavone: comparison with indomethacin. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 5, p. 647-651, 2004.

TESCH, B. J. Herbs commonly used by women: a evidence-based review. **Am J Gynecol**, v. 188, p. 44-55, 2003.

TUCKER, H. A. Lactation and its hormonal control. In: KNOBIL, E; NEIL, J., **The physiology of reproduction**, 1994. cap. 57, p.1065-1098, 1994.

VANDENBERG, L. N. et al. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. **Reprod Toxicol**, v. 26, n. 3-4, p. 210-9, Nov-Dez. 2008.

VIEIRA, M. L. Comportamento materno e paterno em roedores. **Biotemas**, v. 16, n. 2, p. 159-180, 2003.

WAKERLEY, J. B. Milk ejection and its control. In: NEIL, J., **Physiology of reproduction**, cap. 59, p.3129-3190, 2006.

WU, Z. et al. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 1, p. 167-72, Jan. 2005.

YAMAZAKI, I. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. **Life Sci**, v. 38, n. 8, p. 757-64, Fev. 1986.

YOSHIDA, K. et al. Disposition of ipriflavone (TC-80) in rats and dogs. **Radioisotopes**, v. 34, n. 11, p. 618-23, Nov. 1985.