

PEDRO MARTINS BELLE¹

MARCELLA MARTINS TERRA²

VERA MARIA PETERS³

MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA³

AMAURY TEIXEIRA LEITE DE ANDRADE³

Efeito da ipriflavona sobre ratas Wistar e suas ninhadas

Effect of ipriflavone on Wistar rats and their litters

Artigo Original

Palavras-chave

Isoflavonas/administração & dosagem
Desenvolvimento fetal/efeitos de drogas
Ratos
Gravidez

Keywords

Isoflavones/administration & dosage
Fetal development/drug effects
Rats
Pregnancy

Resumo

OBJETIVO: Avaliar os efeitos da ipriflavona durante a fetogênese, já que não foram encontrados estudos visando avaliar seu efeito durante este período. **MÉTODOS:** Foram utilizadas 60 ratas prenhes, distribuídas aleatoriamente em quatro grupos (n=15). G-controle (1 mL de água destilada) e três grupos tratados com ipriflavona, via intragástrica, do 16^o ao 20^o dia pós-coito (PC): G-300 (300 mg/kg), G-1.500 (1.500 mg/kg) e G-3000 (3.000 mg/kg). Os animais foram pesados e sacrificados no 21^o dia por exsanguinação total sob anestesia (xilazina (10 mg/kg) e quetamina (90 mg/kg) via intraperitoneal. Foi realizado hemograma completo e dosagens séricas de colesterol, triglicérides, AST, ALT, ureia, creatinina e glicose das ratas prenhes. Após laparotomia foram removidos e pesados fígado, rim, suprarenais, baço e ovários; os fetos e placentas foram pesados obtendo-se o peso médio das ninhadas. Quatro fetos (dois machos e duas fêmeas) por mãe foram aleatoriamente designados para obter-se o comprimento e peso de cérebro, fígado, rins e pulmões. Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Dunnett; para dados não homocedásticos e sem distribuição normal, foi usado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney; as proporções foram analisadas pelo teste do χ^2 (p<0,05) **RESULTADOS:** Níveis de triglicérides (mg/dL): G-Controle (138,8±21,8); G-300 (211,2±63,9); G-1.500 (251,5±65,2); G-3000 (217,7±49,6); p<0,05. Peso corporal dos fetos (g): G-Controle (machos 3,3±0,3; fêmeas 3,1±0,3); G-300 (machos 3,4±0,2; fêmeas 3,1±0,4); G-1.500 (machos 3,5±0,3; fêmeas 3,2±0,3); G-3000 (machos 3,4±0,5; fêmeas 3,1±0,4). **CONCLUSÃO:** A ipriflavona não causou toxicidade materna, mas elevou níveis de triglicérides e reduziu o hematócrito em doses elevadas, o tamanho, peso corporal e de órgãos fetais não foram alterados. Não foram observadas malformações externas nem mortes fetais.

Abstract

PURPOSE: Evaluate the effects of ipriflavone during fetogenesis, since no studies have been conducted to assess its effect during this period. **METHODS:** 60 pregnant rats were divided randomly into four groups (n=15). G-control (1 mL of distilled water) and three groups treated intragastrically with ipriflavone from the 16th to the 20th post coitus (PC) day: G-300 (300 mg/kg), G-1,500 (1,500 mg/kg) and G-3,000 (3,000 mg/kg). The animals were weighed, anaesthetized intraperitoneally with xylazine and ketamine at doses of 180 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, and sacrificed by total exsanguination on the 21st day. A complete blood count was performed and serum cholesterol, triglycerides, AST, ALT, urea, creatinine, and glucose were determined in pregnant rats. After laparotomy, the liver, kidneys, adrenals, spleen and ovaries were removed and weighed; fetuses and placentas were also weighed to obtain the average weight of the litters. Four fetuses (two males and two females) were chosen at random for the determination of the length and weight of brain, liver, kidneys and lungs. Statistical analysis: ANOVA followed by Dunnett's test. For raw data without normal distribution and homoscedasticity, we used the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test. Proportions were analyzed by the χ^2 test (p<0.05). **RESULTS:** Triglyceride levels (mg/dL) were: Control-G (138.8±21.8), G-300 (211.2±63.9) G-1,500 (251.5±65.2) G-3,000 (217.7±49.6); p<0.05. The body weight of fetuses (g) was: G-Control (male 3.3±0.3; female 3.1±0.3), G-300 (male 3.4±0.2; female 3.1±0.4), G-1,500 (male 3.5±0.3; female 3.2±0.3), G-3,000 (male 3.4±0.5; female 3.1±0.4). **CONCLUSION:** Ipriflavone did not cause maternal toxicity, but increased triglyceride levels and reduced hematocrit at higher doses. The body and organ weights of the fetuses did not change with dam treatment. There were no external malformations or fetal deaths.

Correspondência:

Amury Teixeira Leite de Andrade
Centro da Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora
Rua José Lourenço Kelmer s/n – Campus Universitário
CEP: 36036-900
Juiz de Fora (MG), Brasil

Recebido

05/09/2011

Aceito com modificações

13/12/2011

Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

¹ Programa de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas do Programa Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

² Curso Acadêmico Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil; Bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPMIG.

³ Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

Introdução

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona) é uma isoflavona sintética, derivada da daidzeína, encontrada em grãos de soja e derivados, sendo comercializada com a finalidade de prevenir e/ou tratar a osteoporose¹⁻⁴.

Foi verificado *in vitro* que a ipriflavona induz a apoptose em células epiteliais gástricas⁵ e inibe a proliferação e síntese de DNA de células tumorais ósseas⁶. Em estudo prévio realizado em nosso laboratório, foi observado que a ipriflavona exerceu efeito anti-implantação em blastocistos de ratas Wistar⁷.

Com relação ao efeito da ipriflavona no desenvolvimento embrionário, foi verificada sua atuação na via de sinalização Hedgehog, sabendo-se que a perturbação nesta via pode causar graves defeitos congênitos nos conceptos⁸.

Estudos com a daidzeína, precursora da ipriflavona, mostram efeito anti-implantação em ratas⁹ e redução da produção de progesterona em células trofoblásticas humanas¹⁰. Sabe-se também que a genisteína, estruturalmente semelhante à ipriflavona, lesa blastocistos de camundongos, cultivados *in vitro*, induz apoptose, diminui o número de células, retarda o desenvolvimento pós-implantação e aumenta incidência de morte precoce de blastocistos e *in vivo* induz apoptose e inibe a proliferação celular do blastocisto¹¹.

A fetogênese é um período do desenvolvimento embrionário caracterizado por intensa mitose e proliferação celular, onde a apoptose é extremamente importante para a remodelação de órgãos e tecidos¹²⁻¹⁴, assim, a ipriflavona poderia interferir no desenvolvimento fetal, tanto pela inibição da proliferação celular quanto pelo estímulo à apoptose.

Dada a grande utilização da ipriflavona na prevenção de osteoporose^{3,4} e os efeitos acima mencionados, tanto da ipriflavona quanto de seu precursor daidzeína, tornou-se importante avaliar o desenvolvimento fetal em ratas expostas à ipriflavona, que foi o objetivo do presente estudo.

Métodos

Foram usadas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) com 180±15 g de peso, nulíparas e nuligestas, com três meses de idade, obtidas na colônia do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde são criadas em racks com ventilação e umidade controladas,

em gaiolas providas de tampas com filtro Millipore, localizados em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas (fotoperíodo de 12 h de ciclo claro/escuro).

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

Desenho experimental

Os animais foram acasalados no sistema poligâmico, com machos de fertilidade previamente comprovada, ao final da tarde (17h00), na proporção de três fêmeas para um macho. Na manhã seguinte, identificaram-se os animais inseminados pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, sendo este dia designado o dia zero de gestação.

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, cada grupo contendo 15 animais: G-Controle, G-300, G-1.500 e G-3.000. Os grupos G-300, G-1.500 e G-3.000 receberam, respectivamente, via intragástrica, duas vezes ao dia (7 e 19h), 1 mL de suspensão aquosa de ipriflavona, nas doses de 300, 1.500 e 3.000 mg/kg/dose (dose terapêutica, 5 e 10 vezes a dose indicada para uso humano), mesmas doses usadas em trabalho anterior em nosso laboratório⁷. Diariamente, os animais eram pesados e a ipriflavona diluída em água destilada de acordo com as proporções mencionadas. As ratas do grupo G-Controle receberam, pela mesma via, 1 mL de água destilada. O tratamento foi realizado do 16° ao 20° dia de prenhez, período correspondente à fetogênese em ratos¹⁵, via intragástrica, por gavagem, às 6h00 e 18h00.

Variáveis maternas

As ratas prenhes foram observadas diariamente para a avaliação de sinais clínicos de toxicidade materna (pi-loereção, hipo ou hiper motilidade no interior da gaiola, estereotípias, cromodaciorreia, diarreia, perdas sanguíneas vaginais e mortes)¹⁵.

A estimativa do consumo materno de ração também foi registrada durante toda a gestação. Para isso, foram oferecidos a cada animal, diariamente, sempre no mesmo horário, 25 g de ração. No dia seguinte, estimou-se o consumo através da diferença de peso entre a sobra da ração encontrada em cada gaiola e o que foi colocado na véspera.

O peso corporal de cada animal foi medido a cada três dias, a partir do primeiro e até o 16º dia de prenhez. A partir daí, as ratas foram pesadas diariamente até o dia do sacrifício, quando foi obtido o peso antes e após a remoção do trato reprodutor e seu conteúdo.

O sacrifício foi realizado por exsanguinação total sob anestesia (90 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina, via intraperitoneal) no 21º dia de prenhez. No sangue obtido, foram determinados: hematimetria, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e índices hematimétricos volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HCM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM), utilizando-se analisador automático de células hematológicas. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa, sendo que em cada extensão foram analisadas e contadas 100 células. Dosou-se também a concentração plasmática de colesterol, triglicérides, aspartato transaminase, alanina transaminase, ureia e creatinina.

Os órgãos maternos foram examinados para identificação de alterações morfológicas e o baço, os rins e o fígado foram retirados e pesados.

Removido o sistema reprodutor, os ovários foram dissecados, pesados e seus corpos lúteos contados com auxílio de microscópio estereoscópico.

Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente, sendo mantida sua posição anatômica, e os implantes foram numerados da extremidade ovárica esquerda até a direita. Foram então contados fetos vivos (os que se moviam espontaneamente ou sob o toque de uma pinça), mortos, reabsorções precoces e tardias (reabsorções precoces caracterizam-se por não serem identificados restos embrionários ou placentários e reabsorções tardias por conterem esses elementos). Os fetos mortos e vivos foram pesados separadamente e sexados pela observação da distância anogenital. As placentas foram separadas do âmnio e do cordão umbilical e foram pesadas. Fetos e placentas foram pesados agrupados por ninhada e sexo. Posteriormente, foram sacrificados aleatoriamente quatro fetos por ninhada (dois machos e duas fêmeas) por crióanestesia, medidos individualmente com um paquímetro, do ápice do nariz à base da cauda, e examinados para a verificação de malformações externas (fenda palatina, lábio leporino, polidactilia, extrofia cardíaca, celossomia, anoftalmia e outros) com o auxílio de um microscópio estereoscópico Zeiss®. Em seguida, foram necropsiados e as vísceras abdominais e

torácicas examinadas; cérebro, rins, fígado e pulmões foram removidos, pesados e fixados.

A ipriflavona utilizada no experimento foi produzida na China, exportada pela empresa Nanjing Wellchem Enterprise CO. Ltda., 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).

■ Análise estatística

Todos os resultados foram analisados com o auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 13.0*. Os dados obtidos foram analisados através do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Para dados não homocedásticos e sem distribuição normal, foi usado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. Proporções foram analisadas pelo teste do χ^2 . O nível de significância dos testes foi de $\alpha=0,05$.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o Protocolo nº 024/2008.

Resultados

Nenhuma rata apresentou sinais clínicos de toxicidade materna e não foi verificada nenhuma morte. A média do consumo de ração e do ganho de peso dos animais expostos à ipriflavona (G-300, G-1.500 e G-3.000) não apresentou diferença significativa durante o experimento quando comparados aos animais do grupo G-controle.

Não se observaram diferenças significativas entre os pesos de fígado, baço, rins, suprarenais e ovários das ratas tratadas com ipriflavona, ou na proporção de reabsorções, número de corpos lúteos, de implantes e de fetos vivos (Tabela 1). Na Tabela 1, pode-se observar aumento na concentração plasmática de triglicérides das ratas tratadas com doses crescentes de suspensão aquosa de ipriflavona. Com relação ao hemograma, os animais do grupo G-1.500 e G-3.000 tiveram redução do hematócrito, quando comparados aos animais do grupo G-controle.

A Tabela 2 mostra as variáveis fetais analisadas. Os pesos de fetos e das placentas foram semelhantes em todos os grupos. Os tamanhos, pesos corporais e dos órgãos dos fetos do sexo feminino e masculino não diferiram significativamente entre os grupos experimentais. Não foram observadas malformações externas em nenhum dos fetos examinados.

Tabela 1. Efeito da solução aquosa de ipriflavona nas ratas Wistar durante a fetogênese nos vários grupos estudados

	Controle (n=15)	G-300 (n=15)	G-1.500 (n=15)	G-3.000 (n=15)
Fígado (g)	8,7±0,9	9,0±1,0	8,9±0,7	8,6±1,0
Rins (g)	1,3±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1
Suprarenais (mg)	62±8,4	64,6±9,2	63,5±9,3	59,6±9,1
Baço (mg)	42,3±8,0	43,5±9,0	41,0±6,1	43,5±4,4
Ovários (mg)	70,9±9,6	73,2±9,6	65,8±14,4	67,2±14,0
Proporção de reabsorções (%) [*]	4,4 (7/159)	3,2 (5/156)	6,0 (9/149)	5,4 (7/130)
Corpos lúteos	12,3±1,4	12,0±1,4	11,1±2,0	11,3±1,3
Implantes	11,4±2,3	10,4±1,8	9,93±1,6	9,3±2,9
Fetos vivos	10,3±3,3	10,0±1,6	9,33±1,9	8,7±2,9
Hematimetria (x10 ³ cel/mm ³)	5.592.000±528.369,5	5.092.667±454.681,5	4.989.333±589.375,8*	5.143.571±809.088,8
Hemoglobina (mg/dL)	10,5±0,8	10,0±0,3	10±0,8	10,0±1,1
Hematócrito (%)	30,8±2,4	29,3±2,1	28,1±4,3*	27,8±2,5*
Colesterol (mg/dL)	94,7±14,5	100,3±17,1	91,4±19,7	87,4±17,2
Triglicérides (mg/dL)	138,8±21,9	211,3±63,9*	251,5±65,2*	217,8±49,6*
AST (U/L)	46,7±11,2	51,7±30,8	56,0±27,3	47,4±16,8
ALT (U/L)	34,9±6,8	39,7±6,7	35,1±7,7	34,9 ± 11,8
Ureia (mg/dL)	44,7±8,8	42,7±8,3	37,0±11,1	42,6±9,6
Creatinina (mg/dL)	0,7±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1
Glicose (mg/dL)	89,6±14,5	80,9±20,5	77,9±19,9	87,0±24,3

Resultados apresentados como média±desvio padrão; Controle: 1 mL de solução fisiológica; G-300: 300 mL/kg de solução aquosa de ipriflavona; G-1.500: 1.500 mL/kg de solução aquosa de ipriflavona; G-3.000: 3.000 mL/kg de solução aquosa de ipriflavona; n: número de casos estudados; *p<0,05.

Tabela 2. Efeito da solução aquosa de ipriflavona nos fetos das ratas Wistar expostas durante a fetogênese

Variáveis	Controle (n=15)		G-300 (n=15)		G-1.500 (n=15)		G-3.000 (n=15)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Fetos	3,4±0,3	3,2±0,3	3,5±0,2	3,2±0,4	3,5±0,3	3,2±0,3	3,4±0,5	3,1±0,4
Placentas	0,5±0,0	0,4±0,0	0,4±0,0	0,4±0,1	0,5±0,0	0,5±0,1	0,5±0,0	0,5±0,0
Tamanho	4,0±0,2	3,9±0,2	4,1±0,1	3,9±0,2	4,1±0,1	4,0±0,1	4,1±0,1	3,9±0,2
Fígado	269,6±38,1	263,3±37,6	272,7±48,2	258,7±41,2	285,0±39,1	274,0±28,8	267,9±48,0	255,5±55,9
Rins	26,3±4,0	24,3±3,4	25,1±5,3	24,1±4,0	26,4±3,1	24,2±3,7	23,1±5,9	22,9±4,0
Pulmões	114,1±15,1	104,1±10,1	109,5±18,3	100,1±14,2	115,7±11,7	103,5±11,0	103,3±10,7	97,5±16,4
Cérebro	128,6±14,5	122,7±12,8	129,1±16,2	126,6±15,1	127,3±12,8	123,2±8,9	128,5±11,5	122,8±20,5

Resultados apresentados como média±desvio padrão; Controle: 1 mL de solução fisiológica; G-300: 300 mL/kg de solução aquosa de ipriflavona; G-1.500: 1.500 mL/kg de solução aquosa de ipriflavona; G-3.000: 300 mL/kg de solução aquosa de ipriflavona; n: número de casos estudados; M: fetos do sexo masculino; F: fetos do sexo feminino; *p<0,05.

Discussão

A toxicidade materna é uma das causas de alterações no desenvolvimento embrionário e pós-natal¹⁶, sendo diagnosticada particularmente pela perda de peso corporal¹⁷, embora outras alterações como redução da locomoção, diarreia, piloereção e redução do consumo de água e alimento e mortes¹⁵ também sejam considerados. Na maioria dos casos, a perda de peso materno é causada por redução no consumo de alimento ou de água e se reflete na geração de feto de baixo peso corporal¹⁷, além de alterações do eixo hipotálamo-hipófise¹⁸. No presente trabalho, não se

observou perda de peso corporal, de consumo de ração nem outros sinais clínicos que denotassem toxicidade materna, o que sugere ausência de toxicidade observável clinicamente.

Diferentemente da redução da concentração plasmática de colesterol total e triglicérides^{19,20} identificada em mulheres não grávidas sob dieta rica em isoflavonas, no presente trabalho foi observado aumento das concentrações de triglicérides em todas as doses, fato também já observado por outros autores²¹ que demonstraram em ratos, que a daidzeína, precursora da ipriflavona, aumentou o nível sérico de triglicérides. Dessa forma, é possível sugerir que

a ipriflavona aumente a concentração de triglicérides em ratas prenhes, sendo esse o primeiro relatado na literatura. A redução do hematócrito nas doses mais elevadas está sendo objeto de estudos, uma vez que no presente estudo não teve explicação plausível.

A via de sinalização Hedgehog é um mediador chave no crescimento, morfogênese e diferenciação que ocorre no desenvolvimento embrionário em mamíferos, sendo que a interrupção desta via pode causar defeitos congênitos graves, como lábio leporino, fenda palatina e defeito na formação dos membros²²⁻²⁴. Apesar de a ipriflavona atuar nesta via⁸, no presente estudo não foi verificada a presença de malformações fetais em ratas expostas às doses crescentes de ipriflavona durante a fetogênese, o que pode se dever à administração em fase tardia da prenhez.

Na fetogênese, ocorre basicamente o rápido crescimento do corpo e a diferenciação de órgãos, tecidos e sistemas, resultando em ganho de peso e crescimento corporal muito grande, sendo característicos deste período a histogênese, maturação funcional e crescimento^{13,14}. A desnutrição materna, alterações na concentração de vitamina A, genes como *adrenomedullin*, hormônios, agentes tóxicos e muitos outros podem alterar o crescimento e desenvolvimento fetal²⁵⁻²⁷. O fato de não ter sido encontrada redução de tamanho e peso fetais, bem como nos pesos dos órgãos fetais examinados, sugere que a ipriflavona não causou restrição do crescimento, não alterando o processo morfogênico fetal.

A apoptose é um dos mecanismos envolvidos na morfogênese de sistemas, órgãos e tecidos fetais²⁸. Na formação dos membros dos vertebrados, a apoptose é essencial para a separação dos dígitos; assim como na formação do sistema nervoso, onde a apoptose causa uma extensa morte de neurônios¹². A ipriflavona, através da indução de apoptose⁵, poderia causar, entre outros efeitos, redução da massa encefálica ou aumento dos sulcos interdigitais, o que não foi observado no presente trabalho, novamente reforçando a hipótese de não interferência com o desenvolvimento morfológico dos fetos.

Sabe-se que a genisteína e a daidzeína reduzem a produção de progesterona nas células trofoblásticas humanas, provavelmente devido ao bloqueio dos receptores de estrógeno causado pelos fitoestrógenos¹⁰. Alterações na função placentária poderiam causar alteração no desenvolvimento fetal. No presente trabalho, não se observou alteração do peso das placentas e tampouco do peso e tamanho dos fetos, o que pode ser uma indicação de ausência de alteração placentária.

A restrição de crescimento intrauterino (RCIU) é causada por alterações nos processos de divisão celular que levam ao crescimento corporal e diferenciação de órgãos, tecidos e sistemas^{29,30}, ocasionando o desenvolvimento de órgãos hipotrofiados, hipofuncionais e deficiência no crescimento do feto^{13,29}.

A ipriflavona, como um inibidor da síntese de DNA em células tumorais, poderia diminuir a síntese de DNA durante o desenvolvimento fetal levando à RCIU nos fetos expostos à ipriflavona durante a fetogênese. Entretanto, no presente trabalho, tanto o tamanho quanto o peso corporal e dos órgãos fetais não apresentaram diferença significativa quando comparados aos fetos que não foram expostos à ipriflavona na gestação, quer se refiram a fetos de sexo masculino quanto ao feminino.

Com os dados obtidos, pode-se concluir que a administração de 300, 1.500 e 3.000 mg/kg/dose de suspensão aquosa de ipriflavona durante o período de fetogênese de ratas não causou toxicidade clínica materna, mas elevou os níveis de triglicérides. O crescimento fetal não foi alterado e não ocorreram mortes fetais.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro através das Redes Mineiras de Bioterismo e TOXIFAR (Redes 172 e 173/2008, Demanda Universal – CDS – APQ – 2120-4 04/2007).

Referências

1. Yun C, Ding L, Leng Y, Zhu H, Wen A, Yang L. Determination of ipriflavone in human plasma by LC-MS and its application in a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2012;26(1): 123-8.
2. Zhang X, Li SW, Wu JF, Dong CL, Zheng CX, Zhang YP, et al. Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(2):76-80.
3. Chung HJ, Kang HE, Yang KH, Kim SY, Lee MG. Ipriflavone pharmacokinetics in mutant Nagase analbuminemic rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2009;30(6):294-304.
4. Pinto AS, Oliveira TT, Del Carlo RJ, Nagem TJ, Fonseca CC, Moraes GHK, et al. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. *RBCF Rev Bras Ciênc Farm.* 2006;42(1):99-107.
5. Tani S, Matsuda K, Tanaka T. Induction of apoptosis in cultured rat gastric epithelial cells by ipriflavone: comparison with indomethacin. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(5):647-51.
6. Iwasaki T, Mukai M, Tsujimura T, Tatsuta M, Nakamura H, Terada N, et al. Ipriflavone inhibits osteolytic bone metastasis of

- human breast cancer cells in a nude mouse model. *Int J Cancer*. 2002;100(4):381-7.
7. Fernandes ES, Santos TR, Oliveira TT, Guerra MO, Peters VM, Andrade AT. Avaliação do potencial interceptivo da ipriflavona em ratas wistar. *Rev Interdisciplin Estud Exp*. 2011;2(1). [In press]
 8. Lipinski RJ, Bushman W. Identification of Hedgehog signaling inhibitors with relevant human exposure by small molecule screening. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(5):1404-9.
 9. Wu Z, Yang Y, Chen Y, Xia G, Zhang R. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(1):167-72.
 10. Richter DU, Mylonas I, Toth B, Scholz C, Briese V, Friese K, et al. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on progesterone and estrogen (estradiol) production of human term trophoblast cells in vitro. *Gynecol Endocrinol*. 2009;25(1):32-8.
 11. Chan CW, Lu HY, Shiao NH. Effect of genistein on mouse blastocyst development in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(2):238-45.
 12. Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E. *Princípios de biologia do desenvolvimento*. Porto Alegre: Artmed; 2000.
 13. Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
 14. Paumgarten F, Solecki R, Buschmann J, Clark R, Grote K, Rauch M, et al. Harmonization of terminology in developmental toxicology: the quest for a more precise description and a harmonized classification of fetal observations. *Reprod Toxicol*. 2009;27(1):8-13.
 15. Christian MS. Test Methods for assessing female reproductive and development toxicology. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis; 2001. p. 1301-81.
 16. Khera KS. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology*. 1985;31(1):129-53.
 17. Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the "no observed adverse effect level". *Reprod Toxicol*. 2008;25(2):192-202.
 18. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Bréant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*. 2001;42(5):1692-702.
 19. Vincent A, Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: are they useful in menopause? *Mayo Clin Proc*. 2000;75(11):1174-84.
 20. Cederroth CR, Nef S. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;304(1-2):30-42.
 21. Sosić-Jurjević B, Filipović B, Ajdžanović V, Brkić D, Ristić N, Stojanoski MM, et al. Subcutaneously administered genistein and daidzein decrease serum cholesterol and increase triglyceride levels in male middle-aged rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232(9):1222-7.
 22. Lipinski RJ, Song C, Sulik KK, Everson JL, Gipp JJ, Yan D, et al. Cleft lip and palate results from Hedgehog signaling antagonism in the mouse: phenotypic characterization and clinical implications. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(4):232-40.
 23. Lipinski RJ, Hutson PR, Hannam PW, Nydza RJ, Washington IM, Moore RW, et al. Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the Hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. *Toxicol Sci*. 2008;104(1):189-97.
 24. Lipinski RJ, Dengler E, Kiehn M, Peterson RE, Bushman W. Identification and characterization of several dietary alkaloids as weak inhibitors of Hedgehog signaling. *Toxicol Sci*. 2007;100(2):456-63.
 25. Takahashi K, Wakai T, Nakagawa K, Hoshiai H, Wada Y. Prolactin releasing action of the hypothalamic extract in last stage of pregnant rats (author's transl). *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*. 1975;51(12):1015-23.
 26. Campbell S. Fetal growth. In: Beard RW, Nathanielz WB, editors. *Fetal physiology and medicine*. 3rd ed. London: W.B. Saunders; 1976. p. 271-8.
 27. Witlin AG, Li ZY, Wimalawansa SJ, Grady JJ, Grafe MR, Yallampalli C. Placental and fetal growth and development in late rat gestation is dependent on adrenomedullin. *Biol Reprod*. 2002;67(3):1025-31.
 28. Jezek D, Kozina V. Apoptosis during embryo development. *Acta Med Croatica*. 2009;63 Suppl 2:37-41.
 29. Ergaz Z, Avgil M, Ornoy A. Intrauterine growth restriction—etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models? *Reprod Toxicol*. 2005;20(3):301-22.
 30. Burdan F. Intrauterine growth retardation and lack of teratogenic effects of prenatal exposure to the combination of paracetamol and caffeine in Wistar rats. *Reprod Toxicol*. 2003;17(1):51-8.