

## Efeitos das isoflavonas em altas doses sobre o útero da rata

ADRIANA APARECIDA FERRAZ CARBONEL<sup>1</sup>, RICARDO SANTOS SIMÕES<sup>2</sup>, REGIANE HELENA BARROS RABELO SANTOS<sup>3</sup>,  
MARIA CÂNDIDA PINHEIRO BARACAT<sup>4</sup>, MANUEL DE JESUS SIMÕES<sup>5</sup>, EDMUND CHADA BARACAT<sup>6</sup>, JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Mestre em Ciências da Saúde; Doutoranda, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), São Paulo, SP

<sup>2</sup> Médico-assistente do Hospital Universitário, Universidade de São Paulo (HU-USP); Doutorando da Disciplina de Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP

<sup>3</sup> Pós-graduanda do Departamento de Ginecologia, UNIFESP-EPM, São Paulo, SP

<sup>4</sup> Médica-residente de Obstetrícia e Ginecologia, FMUSP, São Paulo, SP

<sup>5</sup> Professor Associado, Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP-EPM, São Paulo, SP

<sup>6</sup> Professor Titular, Disciplina de Ginecologia, FMUSP, São Paulo, SP

<sup>7</sup> Professor Associado e Livre-docente, Departamento de Ginecologia, UNIFESP-EPM, São Paulo, SP

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito de altas doses de isoflavonas no útero de ratas adultas castradas. **Métodos:** Ratas virgens ovariectomizadas (n = 40) foram tratadas por 30 dias consecutivos com veículo (GCtrl) ou genisteína nas concentrações 42 (GES42), 125 (GES125) e 250 (GES250) µg/g de peso corporal ao dia. O extrato de soja e o veículo (propilenoglicol) foram administrados por gavagem. Ao final do experimento, foi realizada dosagem sérica de 17 β-estradiol e progesterona, avaliou-se o peso dos animais e dos úteros e foi feito exame colpocitológico. Fragmentos do terço médio dos cornos uterinos foram fixados em formol a 10% e processados para inclusão em parafina para estudo histológico. Cortes de 5 µm de espessura foram corados pelo HE e destinados a estudo em microscopia de luz. Analisou-se a histomorfologia do endométrio, área endometrial, número e área ocupada pelas glândulas, assim como a concentração de eosinófilos presentes na lâmina própria. Os dados numéricos obtidos foram submetidos à análise de variância complementada pelo teste de Tukey-Kramer (p < 0,05). **Resultados:** Verificou-se que o peso do útero, as áreas endometrial e glandular e o número de glândulas e de eosinófilos foram maiores nos animais dos grupos GES250 > GES125 do que nos outros grupos (GES250 > GES125 > GES42 = GCtrl; p < 0,05). Os dados morfológicos mostraram proliferação endometrial nos grupos ES125 e ES250, que apresentavam endométrio mais desenvolvido que outros grupos. Em todos os animais do grupo ES250 notou-se a presença de metaplasia escamosa. **Conclusão:** A administração de isoflavonas em altas doses promove metaplasia escamosa no endométrio.

**Unitermos:** Isoflavonas; ovariectomia; útero; metaplasia; ratos.

### SUMMARY

#### Effects of high-dose isoflavones on rat uterus

**Objective:** To evaluate the effects of high-dose isoflavones on the uterus of castrated adult rats. **Methods:** Adult, ovariectomized virgin rats (n = 40) were treated by gavage during 30 consecutive days with vehicle (propylene glycol, group GCtrl) or different doses of genistein: 42 (group GES42), 125 (GES125), or 250 (GES250) µg/g body weight per day. Animals were killed, weighed, vaginal and uterine samples were taken for cytologic evaluation, and serum levels of 17 β-estradiol and progesterone were determined. The middle third of the uterine horns was dissected, fixed in 10% formaldehyde and processed for paraffin inclusion; 5-µm thick sections were obtained and stained with HE for further histological study under light microscopy. The endometrial morphology and area, number and area of glands, and number of eosinophils in the lamina propria were analyzed. ANOVA and the Tukey-Kramer test were used for statistical analyses. **Results:** Uterine weight, endometrial glandular area, and number of glands and eosinophils were all higher in GES250 > G125 than in the other groups (GES250 > GES125 > GES42 = GCtrl; p < 0.05). Morphological data showed signs of endometrial proliferation upon treatment with genistein, especially in animals in GES125 and GES250 compared to other groups. In all animals in GES250, signs of uterine squamous metaplasia were observed. **Conclusion:** A short treatment period with high daily doses of isoflavones can promote endometrial squamous metaplasia in ovariectomized rats.

**Keywords:** Isoflavones; ovariectomy; uterus; metaplasia; rats.

Trabalho realizado no Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP

Artigo recebido: 01/03/2011  
Aceito para publicação: 27/06/2011

Suporte Financeiro:  
CNPq e CAPES

Correspondência para:  
Adriana Aparecida Ferraz Carbonel  
Disciplina de Histologia  
e Biologia Estrutural  
Rua Botucatu, 740  
CEP: 04023-009  
São Paulo – SP  
Tel/Fax: (11) 5576-4268  
adricarbonelfisio@hotmail.com

Conflito de interesse: Não há.

©2011 Elsevier Editora Ltda.  
Todos os direitos reservados.

## INTRODUÇÃO

A atrofia do sistema genital feminino decorrente do hipoestrogenismo é uma condição frequente na pós-menopausa, geralmente associada a sintomas vaginais ou urinários tais como ressecamento, prurido, desconforto, dispareunia, disúria, urgência urinária<sup>1</sup>. Além disso, o hipoestrogenismo pode causar diversas alterações orgânicas que podem levar a sintomas vasomotores, doenças cardiovasculares, osteoporose, distúrbios cognitivos, perda de massa óssea e alterações urogenitais<sup>2</sup>.

A terapia hormonal (TH) é clássica para o alívio dos sintomas vasomotores na pós-menopausa, em especial dos fogachos e da atrofia urogenital. No entanto, devido a efeitos colaterais possíveis sobre a mama e o útero, ou seja, a ocorrência maior de câncer de mama e hiperplasia endometrial, outras alternativas terapêuticas têm sido buscadas<sup>3,4</sup>.

Nos últimos anos, as isoflavonas se tornaram alternativa à TH por serem consideradas mais seguras, visto que são substâncias agonistas do estrogênio e possuem fraca atividade estrínica<sup>5</sup>. As isoflavonas representam os fitoestrogênios mais estudados e são encontradas principalmente em derivados da soja, tendo como principais elementos ativos a genisteína, daidzeína, biochanina A e formononetina<sup>6</sup>. A genisteína é o mais ativo e abundante da soja<sup>7</sup>.

No entanto, apesar de sua eficácia ter sido investigada em inúmeros ensaios clínicos, a maioria deles não conseguiu mostrar sua ação no epitélio vaginal, nem debelar os sintomas vasomotores<sup>8,9</sup>. Chiechi *et al.*<sup>10</sup> referem que isoflavonas administradas na pós-menopausa por longos períodos apresentam efeito trófico sobre o epitélio vaginal. Os autores atribuíram o fato à exposição prolongada aos fitoestrogênios na dieta. Ferrari<sup>11</sup>, por sua vez, refere que altas doses de isoflavonas, particularmente de genisteína, podem ser utilizadas para tratar fogachos em mulheres na pós-menopausa, tendo um perfil de segurança muito bom.

Estudos epidemiológicos mostram que os fitoestrogênios associam-se a redução no risco de câncer estrogênio-dependente<sup>12,13</sup>. Em estudos *in vitro*, em especial com genisteína, há indução de apoptose de células com receptores para estrogênios em tumores mamários e no colo uterino<sup>14</sup>.

No campo experimental, *in vivo*, há inúmeros trabalhos, em especial em ratas, mostrando ação trófica das isoflavonas sobre o genital feminino. Contudo, não foi adequadamente avaliada a resposta desse sistema frente a altas doses<sup>15-17</sup>. Nesse sentido, o presente artigo propõe-se a estudar a ação das isoflavonas em altas doses sobre a morfologia do endométrio de ratas.

## MÉTODOS

Trabalho experimental, prospectivo, duplo-cego, randomizado, no qual foram usadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, pesando aproximadamente 250 gramas, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimen-

to de Modelos de Experimentação (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (parecer nº 0749/07).

## DROGA

O extrato de soja utilizado no presente estudo possuía 42,6% de isoflavonas totais. Desse conteúdo, aproximadamente 36% era de genisteína, 62% de daidzeína e 2% de gliciteína (incluindo as isoformas das isoflavonas). Do restante do extrato 57,4% era constituído de proteínas (Zhonshan Road, Dalian, China).

## ANIMAIS

Foram utilizadas 40 ratas adultas, virgens, de aproximadamente 90 dias, pesando em média 250 g, da linhagem Wistar EPM-1 (*Rattus norvegicus albinus*). Os animais foram inicialmente levados para o Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural, sendo confinados em gaiolas plásticas com tampas gradeadas de metal, à temperatura de 22°C, sob iluminação artificial produzida por lâmpadas fluorescentes da marca Philips, modelo luz do dia, com 40 W de potência, com fotoperíodo claro e escuro de 12h cada. Os animais foram submetidos a exames colpocitológicos por 21 dias consecutivos e os que estavam em ciclo estral normal foram submetidos à ovariectomia bilateral.

Após 28 dias de ovariectomia, os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos, a saber: GCtrl (controle) - recebeu propilenoglicol; GES42 - recebeu 42 µg/g, por dia, de genisteína; GES125 - recebeu 125 µg/g, por dia de genisteína, e GES250 - recebeu 250 µg/g de genisteína por dia.

As substâncias foram ministradas diariamente por um período de 30 dias consecutivos, diluídas em 1,0 mL de propilenoglicol e administradas, no início do fotoperíodo claro, em torno das sete horas, por gavagem.

Na última semana do experimento, foram realizados exames colpocitológicos diários, que foram corados pelo método de Harris-Shorr, para averiguar o estímulo do fito-hormônio. Para tanto, com o auxílio de uma haste de algodão (cotonete) embebida em soro fisiológico, que foi introduzida no óstio da vagina. Retirou-se material do lúmen vaginal, o qual foi depositado sobre lâmina histológica, que foi rapidamente mergulhada em solução de etanol e éter (1:1) durante 10 minutos. Ao final desse período, o material foi corado pelo método Shorr-Harris.

## OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Após 30 dias do início da administração dos fármacos, todos os animais foram inicialmente pesados em balança semianalítica e posteriormente anestesiados com xilazina (20 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg), por via intraperitoneal.

Logo após foi coletado sangue por punção cardíaca e o soro resultante foi separado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a determinação hormonal do  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) e da progesterona ( $P_4$ ).

Após incisão longitudinal do abdome, extraiu-se todo o útero. Em seguida, os animais foram eutanasiados com aprofundamento do plano anestésico. Imediatamente após a sua retirada, o útero foi dissecado, retirando-se toda a gordura, e em seguida pesado em balança de precisão (Mettler-Toledo®), sendo posteriormente seccionado e seu terço médio mergulhado em solução de formaldeído a 10% por 24 horas. As amostras de tecido foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico e diafanizadas em xilol. Em seguida, as peças foram impregnadas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais perpendiculares ao maior eixo dos cornos uterinos que foram corados pela hematoxilina e eosina (HE).

#### ANÁLISE HORMONAL

Os níveis séricos de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) e progesterona ( $P_4$ ) foram determinados. Após a coleta, as amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  ( $1500 \times g$ ) por 10 min e o sobrenadante congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise por radioimunoensaio (RIA), utilizando a técnica de duplo anticorpo em tubos pré-revestidos (ICN Biomedical Inc., Costa Mera, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em duplicata. As amostras foram processadas no mesmo dia. O limite de detecção para a determinação de  $E_2$  e  $P_4$  foram, em média, 0,1 pg/mL e 0,1 ng/mL, respectivamente.

#### ANÁLISE DO MATERIAL

A avaliação morfológica foi feita pela microscopia de luz, com microscópio da marca Carl Zeiss®, com oculares de 10 vezes e com objetivas com aumento de 10 e 40 vezes.

A morfometria foi realizada por digitalização de imagens com o programa AxioVision 4.1 da Carl Zeiss®. Avaliaram-se as áreas ocupadas pelo endométrio e pelas glândulas endometriais presentes no corte histológico de cada animal.

Para a análise das áreas a serem avaliadas, as mesmas foram delimitadas com o auxílio de um mouse e calculadas automaticamente pelo programa AxioVision 4.1 da Carl Zeiss®. Esse procedimento foi realizado para medir as áreas ocupadas pelo endométrio e pelas glândulas endometriais existentes em cada corte histológico do útero de cada rata. O número de eosinófilos foi avaliado contando-se quatro campos, um em cada quadrante de cada corte histológico, em uma área de  $500 \mu\text{m}^2$  em cada quadrante. Em cada animal foram avaliados quatro cortes histológicos.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações. O nível de significância da hipótese nula foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### RESULTADOS

##### PESOS

Notou-se menor peso corporal nas ratas tratadas com iso-flavonas; no entanto, esses dados não mostraram diferenças significativas entre os vários grupos analisados. Já o peso uterino mostrou-se aumentado nos grupos GES250 e GES125 em relação aos demais ( $\text{GES250} > \text{GES125} > \text{GES42} = \text{GCtrl}$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

##### DOSAGEM HORMONAL E COLPOCITOLOGIA

Os níveis séricos de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) e progesterona ( $P_4$ ) não mostraram variação nos seus valores entre os vários grupos de estudo (Tabela 1). Nos animais pertencentes aos grupos GCtrl e GES42, a citologia vaginal mostrou poucos

**Tabela 1** – Pesos corporal e uterino, valores séricos de  $17\beta$ -estradiol, progesterona e morfometria do endométrio, assim como a presença de metaplasia escamosa de ratas tratadas com diferentes doses de genisteína

	Grupos de estudo			
	GCtrl	GES42	GES125	GES250
Peso corporal (g)	238,5 ± 24,4	227,3 ± 33,9	214,2 ± 22,1	217,4 ± 23,9
Peso uterino (g)	2,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,2 ± 1,1 <sup>b</sup>	9,5 ± 1,3 <sup>c</sup>
Estradiol (pg/mL)	2,5 ± 0,4	3,0 ± 1,1	2,8 ± 1,3	3,4 ± 1,6
Progesterona (ng/mL)	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,9	1,9 ± 0,8	1,7 ± 1,5
Metaplasia escamosa	0/10	0/10	0/10	10/10
<b>Endométrio</b>				
Área x $10^5$ ( $\mu\text{m}^2$ )	3,75 ± 1,49 <sup>a</sup>	4,39 ± 1,10 <sup>a</sup>	11,03 ± 4,64 <sup>b</sup>	23,11 ± 5,67 <sup>c</sup>
Nº de glândulas endometriais/área ( $\text{n}^\circ/10^4 \mu\text{m}^2$ )	7,40 ± 3,33 <sup>a</sup>	6,23 ± 3,47 <sup>a</sup>	10,30 ± 2,21 <sup>b</sup>	13,2 ± 3,21 <sup>b</sup>
Área das glândulas endometriais ( $10^4 \mu\text{m}^2$ )	0,32 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,77 ± 0,42 <sup>c</sup>
Eosinófilos ( $\text{n}^\circ/500 \mu\text{m}^2$ )	22,50 ± 8,06 <sup>a</sup>	25,83 ± 5,21 <sup>a</sup>	54,90 ± 14,19 <sup>b</sup>	85,60 ± 11,12 <sup>c</sup>

G, grupo; Ctrl, controle; ES42 = 42  $\mu\text{g}$  de genisteína; ES125 = 125  $\mu\text{g}$  de genisteína; ES250 = 250  $\mu\text{g}$  de genisteína).

As letras sobrescritas indicam as comparações estatísticas: c > b > a; p < 0,05.

elementos celulares, sendo alguns leucócitos (Figuras 1A e B). Já nos grupos GES125 e GES250, o exame revelou grande concentração de células poliédricas, anucleadas e acidófilas oriundas das camadas superficiais (Figuras 1C e D).

#### MORFOLÓGICOS

No estudo morfológico dos animais pertencentes ao grupo controle (GCtrl) e GES42, o útero apresenta basicamente os mesmos aspectos morfológicos, ou seja, mostra-se delgado e atrófico, com poucas glândulas endometriais. O endométrio se encontra revestido por epitélio cúbico simples, sendo em alguns locais do tipo pavimentoso, com lâmina própria contendo inúmeras células de núcleos esféricos, intensamente corados e citoplasma pouco evidente (Figuras 2A e B). Nos grupos GES125 e GES250 notam-se úteros volumosos, com camadas mais espessas. O útero dos animais do grupo GES125 se apresenta revestido por epitélio prismático simples e lâmina própria contendo células com núcleos volumosos, claros, com nucléolos evidentes. Observa-se ainda grande concentração de glândulas endometriais constituídas por células cúbicas e volumosas. No estroma endometrial, observam-se, ainda, inúmeros eosinófilos (Figura 2C). No grupo ES250, o útero apresentou-se bem mais volumoso do que nos outros grupos, contendo líquido viscoso e claro no seu interior, e revestido por epitélio prismático simples, sendo em alguns locais estratificado pavimentoso não cornificado, que indica a presença de metaplasia escamosa (Figura 2D). Notamos, ainda, na maioria dos animais ( $n = 8$ ), saliências na base do epitélio superficial em direção à lâmina própria (Figura 2D). As glândulas endometriais estavam dilatadas, constituídas por células

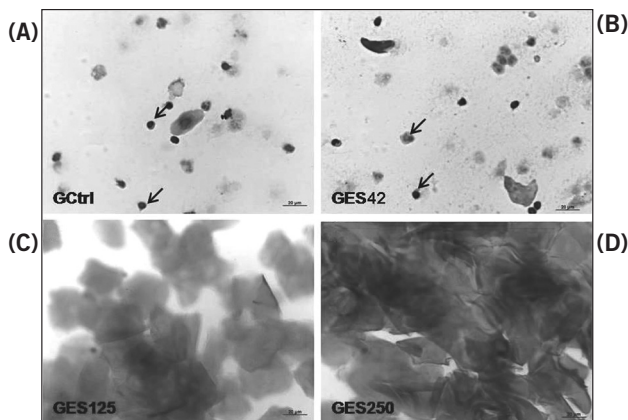
cuboides com núcleo volumoso, sendo em alguns locais constituídas por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, indicando metaplasia escamosa (Figura 2E). Na lâmina própria, é possível observar grande concentração de eosinófilos, sendo que alguns estão infiltrados no epitélio superficial ou glandular (Figuras 2D e E).

#### HISTOMORFOMETRIA

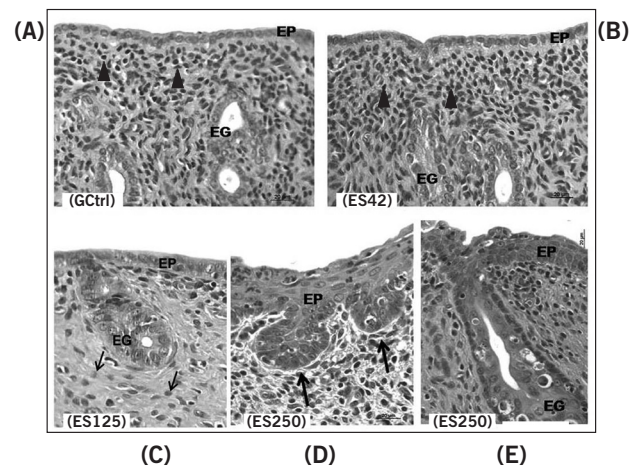
A análise morfométrica do endométrio mostrou haver maior área endometrial, maior número e área ocupada pelas glândulas endometriais, assim como maior número de eosinófilos, no grupo GES250 em relação aos demais (GES250 > GES125 > GES42 = GCtrl;  $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

#### DISCUSSÃO

Após a publicação do estudo WHI, houve aumento considerável de prescrição de isoflavonas e de outros fármacos, pois o referido ensaio clínico randomizado constatou que a terapêutica hormonal da menopausa contendo estrogênios e medroxiprogesterona, ministrados de forma contínua, provocava elevação do risco de câncer de mama e tromboembolismo<sup>18</sup>. A partir de então, as isoflavonas passaram a constituir interessante alternativa terapêutica, principalmente em mulheres após a menopausa com sintomatologia decorrente do hipostrogenismo.



**Figura 1** – Fotomicrografias mostrando colpocitológicas de ratas ovariectomizadas e/ou tratadas com diferentes concentrações de genisteína (G, grupo; Ctrl, controle; ES42 = 42 µg de genisteína; ES125 = 125 µg de genisteína; ES250 = 250 µg de genisteína). Em **A** e **B**, notar escassez de células oriundas da descamação do epitélio vaginal e inúmeros leucócitos (setas). Em **C** e **D** observar células epiteliais anucleadas e acidófilas oriundas das camadas mais superficiais do epitélio vaginal, e em **D** grande concentração de células. Harris-Shorr, 400 X. Barra = 20 µm.



**Figura 2** – Fotomicrografias mostrando partes do endométrio de ratas ovariectomizadas e/ou tratadas com diferentes concentrações de genisteína (G, grupo; Ctrl, controle; ES42 = 42 µg de genisteína; ES125 = 125 µg de genisteína; ES250 = 250 µg de genisteína). Em **A** e **B**, notar endométrio revestido por epitélio superficial (EP) e glandular (EG) do tipo cilíndrico simples com lâmina própria mostrando grande concentração de células com núcleos heterocromáticos (pontas de seta). Em **C** notar epitélio superficial (EP) e glandular (EG) com núcleos volumosos, e na lâmina própria, células com núcleos volumosos e eucromáticos (setas). Em **D** e **E**, observar epitélio superficial (EP) e glandular (EG) do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado (EP). Em **D**, notar brotamentos do epitélio superficial para o interior da lâmina própria (setas). Harris-Shorr, 400 X. Barra = 20 µm.

Entretanto, o impacto clínico do uso das isoflavonas ainda é controverso. Com relação às mamas, Wood *et al.*<sup>19</sup> constataram que elas apresentam efeitos antiestrogênicos, enquanto outros autores observaram ação estrogênica. No tocante ao endométrio, Unfer *et al.*<sup>20</sup> descreveram maior risco de hiperplasia endometrial em usuárias de longa data.

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos das isoflavonas em altas doses no útero de ratas ovariectomizadas. Para tanto, utilizaram-se ratas que se encontravam em um período posterior a 28 dias de ovariectomia. Esse período corresponde ao estado de hipostrogenismo de uma mulher na pós-menopausa<sup>21</sup>.

Com relação à dose de extrato de soja, fonte de isoflavonas, administrada neste estudo, tomou-se como base trabalho prévio sobre o tema, em que, utilizando esse mesmo extrato em ratas, traçou-se curva dose-efeito com relação ao exame colpocitológico e ao peso do útero<sup>22</sup>. As doses aqui selecionadas foram baseadas nos seguintes parâmetros: uma que não alterava o peso do útero e nem o exame colpocitológico (42 µg/g); outra, a menor dose capaz de produzir alteração do peso do útero e também queratinização do epitélio vaginal (125 µg/g). O dobro desta última foi considerado dose alta<sup>22</sup>.

Como esperado, neste experimento notou-se haver aumento do peso do útero dos animais pertencentes aos grupos GES250 e GE125 com relação ao controle e GES42. Esses dados sugerem que as doses de isoflavonas utilizadas atuaram sobre o útero promovendo trofismo dose-dependente. Esses achados já foram referidos por Ishimi *et al.*<sup>23</sup>; Picherit *et al.*<sup>24</sup> e Uesugi *et al.*<sup>25</sup>, que, ao avaliarem o efeito da genisteína na prevenção da perda de massa óssea em ratas castradas, notaram também efeito uterotrófico dose-dependente.

Como era de se esperar, as dosagens hormonais (17 β-estradiol e progesterona) foram baixas e não mostraram haver alterações significativas entre os vários grupos experimentais. No entanto, os aspectos colpocitológicos mostraram que as isoflavonas administradas nas doses de 125 e 250 µg/g tiveram ação proliferativa e de diferenciação sobre o epitélio vaginal, pois o colpocitológico apresentava grande concentração de células anucleadas e acidófilas, sendo dose-dependente.

Estudos têm mostrado que a exposição prolongada de ratas a dietas contendo isoflavonas aumenta a sensibilidade uterina a essas substâncias, efeito mediado por receptores nucleares estrogênio-específicos. O mecanismo de ação das isoflavonas no tecido-alvo resulta, entre outros, em efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos, dependendo do tipo e da concentração de receptor estimulado nos tecidos e da sua concentração no organismo<sup>26</sup>. Atualmente, as isoflavonas são consideradas moduladores seletivos naturais dos receptores de estrogênio (SERMs)<sup>6,27</sup>.

As isoflavonas possuem maior afinidade pelos recep-

tores de estrogênio beta (ERβ)<sup>28</sup>, menos frequentes no endométrio e no tecido mamário em comparação aos receptores-alfa (ERα)<sup>29</sup>. Apresentam atividade 500-1.000 vezes mais fraca que os estrogênios endógenos, mas as isoflavonas podem produzir os mesmos níveis de bioatividade do estradiol, desde que em concentrações altas, suficientes para atingir o máximo de resposta, indicando que o receptor de estrogênio e os complexos receptor-isoflavonoide podem ser funcionalmente equivalentes<sup>30</sup>. Deve ser assinalado que Möller *et al.*<sup>31</sup> referem que a ingestão crônica de isoflavonas aumenta drasticamente a receptividade dos receptores de estrogênio beta no útero de ratas. Além do mecanismo clássico da ação hormonal (genômica), deve-se pensar na presença dos receptores estrogênicos de membrana celular (GPR30/GPRE), assim como nos receptores-beta (monômeros) presos na parte interna da membrana citoplasmática que apresentam efeitos imediatos não genômicos<sup>32</sup>.

Os resultados do presente estudo mostraram hipertrofia do útero com presença de metaplasia escamosa do endométrio, tanto no epitélio superficial quanto no glandular, em todos os animais tratados com altas doses de isoflavonas (250 µg/kg). Esses dados sugerem que as isoflavonas nessas doses têm efeitos proliferativos no endométrio. De fato, estudos experimentais administrando diferentes doses de isoflavonas descrevem ações diversas no tecido endometrial<sup>32-34</sup>. Assim, a dose mínima normalmente utilizada em humanos não apresenta qualquer alteração morfológica. Em contrapartida, altas doses, como a utilizada no grupo GES250, levaram a alterações metaplásicas no endométrio de ratas.

Estudos com 395 mulheres na pós-menopausa, nos quais foram administrados 70 mg/kg de isoflavonas por três meses, mostraram relativa segurança endometrial, não havendo qualquer efeito mitogênico, sendo considerado seguro tanto para o endométrio quanto para a mama. Contudo, não existem dados sobre esse efeito endometrial no longo prazo.

Sacks *et al.*<sup>35</sup> sugerem que o uso de suplementos de isoflavonas nos alimentos ou em pílulas não deve ser recomendado. Por outro lado, muitos produtos de soja considerados benéficos para a saúde cardiovascular teriam suas ações baseadas no alto conteúdo de gorduras poliinsaturadas, fibras, vitaminas, minerais e baixo conteúdo de gordura saturada e não no conteúdo de genisteína.

## CONCLUSÃO

Os resultados desse artigo permitem concluir que a administração de extrato de soja em ratas ovariectomizadas na dose de 125 µg/g de genisteína teve efeito uterotrófico, com aumento da área endometrial, do número de glândulas e de eosinófilos. Já em altas doses (250 µg/g de genisteína), além dos efeitos uterotróficos, nota-se, em todos os animais, o aparecimento de metaplasia escamosa.

## REFERÊNCIAS

- Pastore LM, Carter RA, Hulka BS, Wells E. Self-reported urogenital symptoms in postmenopausal women: women's health initiative. *Maturitas* 2004;49:292-303.
- Cavadas LF, Nunes A, Pinheiro M, Silva PT. Management of menopause in primary health care. *Acta Med Port* 2010;23:227-36.
- Yoshimura T, Okamura H. Short term oral estriol treatment restores normal premenopausal vaginal flora to elderly women. *Maturitas* 2001;39:253-7.
- Lynch C. Vaginal estrogen therapy for the treatment of atrophic vaginitis. *J Women's Health* 2009;18:1595-606.
- Molla MD, Hidalgo-Mora JJ, Soteras MG. Phytotherapy as alternative to hormone replacement therapy. *Front Biosci* 2011;3:191-204.
- Setchell KD. Soy isoflavones-benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 2001;20:354-83.
- Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:465-82.
- Fernandes LFC, Aldrighi APS, Aldrighi JM. Prescrever ou não isoflavonas de soja à mulher no climatério? *Rev Assoc Med Bras* 2006;52:132.
- Villa P, Costantini B, Suriano R, Perri C, Macri F, Ricciardi L *et al.* The differential effect of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women: relationship with the metabolic status. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:552-8.
- Chiechi LM, Putignano G, Guerra V, Schiavelli MP, Cisternino AM, Carriero C. The effect of a soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. *Maturitas* 2003;45:241-6.
- Ferrari A. Soy extract phytoestrogens with high dose of isoflavones for menopausal symptoms. *J Obstet Gynaecol Res* 2009;35:1083-90.
- Trock BJ, Hilakivi-Clarke L, Clarke R. Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:459-71.
- Butler LM, Wu AH, Wang R, Koh WP, Yuan JM, Yu MC. A vegetable-fruit-soy dietary pattern protects against breast cancer among postmenopausal Singapore Chinese women. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1013-9.
- Sakamoto T, Horiguchi H, Oguma E, Kayama F. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *J Nutr Biochem* 2010;21:856-64.
- Mosquette R, Simões MJ, Silva ID, Oshima CT, Oliveira-Filho RM, Haidar MA *et al.* The effects of soy extract on the uterus of castrated adult rats. *Maturitas* 2007;56:173-83.
- Carbonel AAF, Haidar MA, Simões RS, Rabelo RHB, Simões MJ, Soares Jr JM *et al.* Proliferation histomorphometric and immunohistochemical markers on the ovariectomized rat vagina after estrogen and/or isoflavones treatments. *Microsc Microanal* 2010;16:1157-8.
- Carbonel AA, Baracat MC, Simões RS, Simões MJ, Baracat EC, Soares JM Jr. The soybean concentrated extract proliferates the vagina of adult rats. *Menopause* 2011;18:93-101.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Womens Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321-33.
- Wood CE, Register TC, Franke AA, Anthony MS, Cline JM. Dietary soy isoflavones inhibit estrogen effects in the postmenopausal breast. *Cancer Res* 2006;66:1241-9.
- Unfer V, Casini ML, Costabile L, Mignosa M, Gerli S, Di Renzo GC. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 2004;82:145-8.
- Nakao SI, Minamide A, Kawakami M, Boden SD, Yoshida M. The influence of alendronate on spine fusion in an osteoporotic animal model. *Spine* 2011;36(18):1446-52.
- Santos ET, Sampaio MD, Cecon PR, Simões MJ, Sartori MG, Girão MJ. Effects of soy isoflavones on the uterus and urethra of ovariectomized rats. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2010;21:111-6.
- Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C *et al.* Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:697-701.
- Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP *et al.* Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *Br J Nutr* 2001;85:307-16.
- Uesugi T, Toda T, Tsuji K, Ishida H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol Pharm Bull* 2001;24:368-72.
- Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78:67-75.
- Siow RC, Mann GE. Dietary isoflavones and vascular protection: activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? *Mol Aspects Med* 2010;31:468-77.
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 2001;24:351-6.
- Consensus. The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of The North American Menopause Society. *Menopause* 2000;7:215-29.
- Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurdip E. In vitro bioassays of nonsteroidal phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;45:399-405.
- Möller FJ, Diel P, Zierau O, Hertrampf T, Maass J, Vollmer G. Long-term dietary isoflavone exposure enhances estrogen sensitivity of rat uterine responsiveness mediated through estrogen receptor alpha. *Toxicol Lett* 2010;196:142-53.
- Nilsson S, Gustafsson JÅ. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:44-55.
- Alves DL, Lima SM, Silva CR, Galvão MA, Shanaider A, Almeida Prado RA *et al.* Effects of *Trifolium pratense* and *Cimicifuga racemosa* on the endometrium of Wistar rats. *Maturitas* 2008;61:364-70.
- Palacios S, Pornel B, Vázquez F, Aubert L, Chantre P, Marès P. Long-term endometrial and breast safety of a specific, standardized soy extract. *Climacteric* 2010;13:368-75.
- Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Winston M *et al.* Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health: An American Heart Association Science Advisory for Professionals From the Nutrition Committee. *Circulation* 2006;113:1034-44.