

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Júlio Roquete Cardoso

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A ISOFLAVONAS DA SOJA
SOBRE A SAÚDE REPRODUTIVA DE COELHOS MACHOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Júlio Roquete Cardoso
Sônia Nair Bão
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C179e	Cardoso, Júlio Roquete Efeitos da exposição a isoflavonas da soja sobre a saúde reprodutiva de coelhos machos / Júlio Roquete Cardoso. – Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientadora: Sônia Nair Bão. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Fitoestrógenos. 2. Isoflavonas. 3. Reprodução. I. Bão, Sônia Nair. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (scs/ib)
--------------	---

Título em inglês: Effects of exposure to soy isoflavones on the reproductive health of male rabbits.

Palavras-chave em inglês: Phytoestrogens; Isoflavones; Reproduction.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Sônia Nair Bão, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Luis Antônio Violin Dias Pereira, Maria Denise Lopes, Maria Luiza Silveira Mello.

Data da defesa: 05/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 05 de março de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sônia Nair Bão (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga


Assinatura

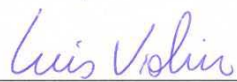
Profa. Dra. Maria Denise Lopes


Assinatura

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello


Assinatura

Prof. Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira


Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Assinatura

À minha querida esposa Priscilla e ao meu pequenino Pedro Henrique.

À minha mãe Lesa e meu irmão Vander.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho e por me ajudar a superar os desafios e amadurecer com eles.

À Profa. Sônia Bão, pelo exemplo, confiança, atenção e respeito. Toda minha gratidão, consideração e admiração.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp por acolher-me.

À Liliam, a quem muito admiro pelos princípios morais e tanto devo pela paciência, prestatividade e competência.

À UPIS – Faculdades Integradas pela disponibilização de instalações físicas, funcionários, equipamentos e subsídio econômico para a execução do projeto. A minha gratidão também por incentivar o meu aperfeiçoamento.

Ao chefe e amigo Rafael Gianella Mondadori, por tantas vezes ter flexibilizado meus horários para atender às minhas atividades do doutorado e pelas sugestões e esclarecimentos.

Aos estagiários Murad, Gislaine, Thiago Sampaio, Andrei, Gabriel, Roberta, Mariana, Thiago Santin e Andréa, que tanto me auxiliaram na execução do projeto.

À Nutrimais Rações pela fabricação das rações de acordo com nossas expectativas.

Ao Rodrigo, Dr. Paulo e à Labormed – Uberlândia pelas análises hormonais.

À Profa. Dra. Shirley, à Profa. Dra. Maria Júlia e à Profa. Dra. Laurecir Gomes, coordenadoras da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural neste período.

Às colegas Alessandra, Soraya e Eliandra pelos incentivos e sugestões produtivas.

Ao colega José Geraldo Vargas, pelas dicas sobre cunicultura e auxílio no primeiro ano de experimento.

Aos colegas do grupo de pesquisa de Células Germinativas do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB (em especial aqueles que convivi por mais tempo: Bruno Arribabene, Bruno Fiorillo, Shélida, Leonora, Larissa, e Vitor), pela gentileza e pelo conhecimento compartilhado nos seminários e discussões semanais.

Aos primeiros Mestres da Universidade Federal de Uberlândia, Professores Renato Souto Severino, Frederico Ozanan Carneiro e Silva, Sérgio Salazar Drummond e André Luiz Quagliatto Santos, que inicialmente me acolheram na iniciação científica e que permitiram que as primeiras portas se abrissem em minha carreira.

Ao prof. Luiz Eustáquio Barbosa pela sugestão do tema.

Aos colegas da UPIS pelo incentivo.

À minha mãe, que sozinha e contra o juízo de todos, acreditou no que parecia impossível.

À minha esposa Priscilla pelo amor incentivo em todos os momentos, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência, e ainda, por trocar vários finais de semana e feriados de descanso por auxílio nas atividades do projeto.

*Ao meu filhinho **Pedro Henrique**, por tornar meus dias mais felizes.*

A todos os animais que foram sacrificados neste experimento, todo o meu respeito.

*“De tudo ficam três coisas:
A certeza de estarmos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser
Interrompidos antes de terminarmos.
Portanto:
Fazer da interrupção um caminho novo,
Da queda um passo de dança,
Do medo uma escada,
Do sonho uma ponte,
Da procura um encontro”.*

Fernando Sabino

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Efeitos benéficos atribuídos ao consumo de fitoestrógenos	2
1.3. Efeitos adversos decorrentes da exposição a fitoestrógenos	3
1.4. Consumo de fitoestrógenos	5
1.5. Mecanismo de ação dos fitoestrógenos em machos	7

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo geral	10
1.6.2. Objetivos específicos	10

2. ARTIGOS

2.1. Efeitos da exposição perinatal a isoflavonas sobre a saúde reprodutiva de coelhos machos	12
2.2. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits	37
2.3. Effects of chronic treatment with soy derived isoflavones on reproductive health of male rabbits	46

3. CONCLUSÕES

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. ANEXOS

RESUMO

Este estudo foi proposto para avaliar se a exposição perinatal (gestacional e lactacional) ou crônica a isoflavonas em dieta contendo soja ou na forma de concentrados de isoflavonas pode comprometer a saúde reprodutiva de coelhos machos. No primeiro experimento, fêmeas foram alimentadas com dieta contendo soja ou dieta isenta de soja e alfafa, suplementada com 10 ou 20 mg/kg/dia de isoflavonas ao longo da gestação e lactação. O grupo controle foi mantido somente com a dieta isenta de soja e alfafa. Na desmama, foram avaliados o peso e a morfologia dos órgãos do aparelho reprodutor e os níveis séricos de testosterona de parte dos filhotes machos. O restante deles foi submetido à dieta controle desde a desmama até a fase adulta. Após a puberdade, os animais foram avaliados quanto ao comportamento sexual, qualidade do sêmen e morfologia dos órgãos reprodutivos. No segundo experimento, fêmeas foram alimentadas com as mesmas dietas empregadas no primeiro experimento, porém a suplementação com isoflavonas foi realizada com doses variando de 2,5 a 20 mg/kg/dia. As doses de isoflavonas foram selecionadas com base em estimativas da ingestão de isoflavonas a partir do consumo de alimentos derivados da soja. Após a desmama, os filhotes machos receberam a mesma dieta fornecida para suas respectivas mães até o fim do experimento. Foi avaliado nestes animais a idade à puberdade, qualidade do sêmen e o comportamento sexual, e, na 33^a semana de vida o peso e a morfologia dos órgãos reprodutivos. Os resultados deste estudo foram baseados em dados obtidos da avaliação de 100 machos num período de 3 anos. O número de espermatozóides esteve de acordo com os valores da literatura para coelhos da raça Nova Zelândia e não variou significativamente em relação ao grupo controle, embora o

volume de sêmen tenha sido menor em coelhos expostos à alta dose de isoflavonas (20 mg/kg/dia). O peso dos órgãos reprodutivos não diferiu estatisticamente do grupo controle e não houve evidência de malformações genitais, alterações metaplásicas, ou qualquer outra alteração histopatológica correlacionada com os tratamentos. Nos jovens, a análise histológica dos testículos não revelou diferenças no desenvolvimento gonadal. Coelhos suplementados de forma crônica com 20 mg/kg/dia de isoflavonas apresentaram menor ingestão de alimentos e peso corporal na fase adulta. Este achado é economicamente importante na produção animal; todavia os animais alimentados com a dieta contendo soja apresentaram na 33ª semana de idade consumo de alimento e peso corporal maiores em 6 e 4% respectivamente do que os animais do grupo controle ($P < 0,05$). Apesar dos recentes alertas, os resultados deste estudo não suportam a hipótese de que a exposição à isoflavonas em doses compatíveis com o consumo de alimentos à base de soja possa comprometer a saúde reprodutiva masculina.

ABSTRACT

This study was proposed to determine if perinatal (that is gestation and lactation) or chronic exposure to isoflavones through consumption of soy containing diet or semipurified soy isoflavones may disrupt male reproductive health of rabbits. In the first experiment, groups of dams were fed either soy containing diet or soy and alfalfa free diet supplemented with soy isoflavones at levels of 10 and 20 mg/kg/day throughout gestation and lactation. The control group was kept on soy and alfalfa free diet only. Reproductive organs weight and morphology and serum levels of testosterone of part of the male offspring were evaluated at weaning. Remaining males were subjected to the control diet from weaning to adulthood. Sexual behavior, semen quality and reproductive organs morphology were evaluated after puberty. In the second experiment, groups of dams were fed same diets employed in the experiment 1, but supplementation with isoflavones were performed with doses ranging from 2,5 to 20 mg/kg/day. Dose levels of isoflavones were selected on the basis of the reported estimative of isoflavones intake from the consumption of soy-based foods. After weaning, male offspring received the same diet, which was given to the respective mother. The age that males reached puberty, semen quality and sexual behavior were evaluated in these animals and at 33 weeks of age reproductive organs weight and morphology were analyzed. Results of this study were sustained by data from the evaluation of 100 males in a period of 3 years. Sperm counts was within literature values for New Zealand rabbits and did not vary significantly in relation to control group, although semen volume has been lesser in rabbits exposed to high levels of isoflavones (20 mg/kg/day). Reproductive organs weight did not differ statistically from the control, and

there was no gross evidence of genital malformations, metaplastic changes, or any histopathologic alteration that was correlated with the treatments. In the young rabbits, histological analysis of the testes did not reveal differences in gonadal development. Rabbits chronically supplemented with 20 mg/kg/day of soy isoflavones showed lesser food intake and body weight at adulthood. This find is economically important in animal production; however the animals fed soy containing diet showed food consumption and body weight 6 and 4%, respectively higher than animals of the control group at 33 weeks of age ($P < 0.05$). In conclusion, despite recent alerts, results of this study did not support the hypothesis that isoflavones consumption at dietary levels may impair male reproductive health.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

Fitoestrógenos (FE) são compostos estrogênicos presentes em vegetais e capazes de mimetizar o efeito dos estrogênios endógenos em vários tecidos e sistemas enzimáticos de animais e humanos. Estes podem ser divididos em três grupos: isoflavonas, coumestanos e lignanos, sendo que as principais fontes são soja e trevo, alfafa, e sementes oleosas, respectivamente. Todos são compostos fenólicos, com similaridade estrutural aos estrogênios naturais e sintéticos (Kurzer e Xu, 1997).

O grupo das isoflavonas é constituído pela genisteína, daidzeína, gliciteína, biochanina A e formononetina (Kurzer e Xu, 1997), destas, a genisteína e a daidzeína são as que apresentam atividade estrogênica mais potente, sendo, portanto, utilizadas na maioria das pesquisas (Lephart et al., 2002). Na maioria das plantas são encontrados na forma de glicosídeos (genistina e daidzina) (Thigpen et al., 1999) e para serem absorvidos, estes devem sofrer hidrólise da molécula de carboidrato por enzimas de bactérias do trato digestório e pelo ácido clorídrico, ou mesmo por glicosidases presentes nos alimentos (Kelly et al., 1993). O tratamento térmico ou o processo de fermentação influencia nas formas das isoflavonas presentes nos alimentos, todavia, não neutralizam seu potencial biológico (Kurzer e Xu, 1997), e sua biodisponibilidade não é afetada pela fonte alimentar (Xu et al., 2000).

1.2. EFEITOS BENÉFICOS ATRIBUÍDOS AO CONSUMO DE FITOESTRÓGENOS

Estudos epidemiológicos, comparando populações asiáticas com ocidentais, têm sido interpretados no sentido de que uma dieta rica em FE protegeria contra neoplasias hormônios-dependentes, perda óssea e doenças cardiovasculares. Conseqüentemente existe um movimento global incentivando o consumo de alimentos ricos em FE e de comprimidos e extratos concentrados de isoflavonas (Clapauch et al., 2002).

As mulheres asiáticas, que consomem uma dieta tradicional com alta quantidade de soja, apresentam baixa incidência de câncer de mama, mas quando migram para os Estados Unidos, a segunda, mas não a primeira geração perde esta proteção (Fritz et al., 1998). Elas apresentam também 1/10 do risco de câncer de endométrio quando comparadas com as caucasianas, que vivem no ocidente (Burke et al., 1996) e apresentam também menor incidência de osteoporose (Cooper et al., 1992). Quando se considera a população masculina, japoneses apresentam menor volume da próstata, mesmo após os ajustes para diferenças em estatura, peso e idade. São também menos susceptíveis à hiperplasia prostática benigna (Masumori et al., 1996) e apresentam menor incidência de câncer de próstata (Strauss et al., 1998). O consumo de isoflavonas por estas populações é da ordem de 20 a 150 mg/dia, níveis absolutamente superiores aos consumidos no ocidente, cerca de 1 a 3 mg/dia (Glazier e Bowman, 2001).

Apesar de que outros fatores, como menor ingestão de gordura e maior ingestão de fibras (Sharpe e Skakkebaek, 1993) devam ser considerados para se interpretar as diferenças entre as populações, resultados de estudos *in vitro* e em animais sustentam a

hipótese do efeito protetor dos FE (Record et al., 1997, Fritz et al., 1998, Agarwal, 2000, Liggins et al., 2000, Ohta et al., 2000, Risbridger et al., 2001, Jarred et al., 2003).

Como antioxidantes, os FE reduzem a oxidação de lipídios, prevenindo a arteriosclerose (Yamakoshi et al., 2000). Em outubro de 1999, o órgão Food and Drug Administration (FDA) autorizou o anúncio em embalagens de alimentos à base de proteína de soja, que o produto diminui o risco de doença cardiovascular. A concessão baseou-se em estudos que apontam que a adição de quantidade a partir de 25 g/dia desse composto (que contém cerca de 50mg de isoflavonas), associada a uma dieta pobre em gordura, levaria à redução do colesterol total e LDL (Clapauch et al., 2002).

1.3. EFEITOS ADVERSOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO A FITOESTRÓGENOS

O aumento do consumo de FE, em especial por crianças, tem causado preocupações sobre o impacto destas substâncias na saúde humana. A exposição se dá por toda a vida e suas conseqüências estão longe de serem conhecidas, quer durante a vida intra-uterina, quer no desenvolvimento e suas repercussões na reprodução (Clapauch et al., 2002).

Os efeitos potenciais dos FE foram reportados pela primeira vez em 1946 em ovinos, na chamada “doença do trevo”. Severos distúrbios reprodutivos culminaram em infertilidade permanente em fêmeas, que pastavam em campos ricos em trevo vermelho na Austrália (Kurzer e Xu, 1997). Mais de 1 milhão de ovelhas tiveram o aparelho reprodutor permanentemente comprometido (Adams, 1990). Carneiros castrados, alimentados com trevo apresentaram galactopoiese, metaplasia escamosa de glândulas anexas ao aparelho reprodutor e estenose uretral (Lindner, 1976). Esta variedade de trevo (*Trifolium pratense*)

possui a maior concentração de FE entre as leguminosas, podendo alcançar 2,5% da matéria seca. Dentre eles, os mais abundantes são a formononetina e a biochanina A (Saloniemi et al., 1995). Na soja, a concentração de FE não ultrapassa 0,16% da matéria seca (Kurzer e Xu, 1997).

Severos distúrbios de fertilidade também foram relatados em vacas, que consumiram silagem a base de trevo vermelho. Todavia, neste caso houve uma melhora progressiva nos índices de fertilidade decorrente da substituição da deita (Kallela et al., 1984). O consumo de alta quantidade de soja por vacas (2,5 kg/animal/dia) reduz o índice de fertilidade e aumenta o número de inseminações por animal, por induzir o aumento da síntese de agentes luteolíticos durante o ciclo estral e início da gestação (Woclawek-Potocka et al., 2005). Não houve descrição de comprometimento reprodutivo de machos nestes casos.

Níveis relativamente altos de FE em dieta contendo soja podem ser um dos maiores fatores responsáveis pela queda de fertilidade de guepardos fêmeas em cativeiro (Setchell et al., 1987). Os felinos apresentaram lesões uterinas, como endométrio cístico, fibrose endometrial e miometrial, de forma semelhante às lesões relatadas em ovelhas na doença do trevo.

Segundo alguns estudos, os FE podem alterar a estrutura cerebral. Em ratos machos, dietas contendo altas concentrações de FE mudaram significativamente a estrutura dos núcleos sexualmente dimórficos da área pré-óptica do hipotálamo (Lephart et al., 2001, 2002). Em humanos, o consumo de tofu (queijo de soja) por homens de meia idade está relacionado ao comprometimento da função cognitiva e atrofia cerebral em idade mais avançada (White et al., 2000).

Exposição à daidzeína (0,1 mg/dia) por 12 semanas causou disfunção erétil em coelhos (Srilatha e Adaikan, 2004). Recentemente, especula-se que o incremento das desordens reprodutivas e a suposta degradação da qualidade do sêmen humano poderia estar relacionada ao aumento da exposição a estrogênios ambientais, inclusive aos FE (Sharpe e Skakkebaek, 1993, Sharpe, 1993, Wisniewski et al., 2003).

Face aos indicativos, tem se sugerido a redução do conteúdo de isoflavonas em alimentos derivados da soja, especialmente nas fórmulas infantis à base de soja (Bocquet et al., 2001). Já se utiliza rações com baixos níveis de fitoestrógenos para animais de laboratório a fim de se evitar um possível comprometimento de ensaios endócrinos e de ordem reprodutiva (Thigpen et al., 1999, Brown e Setchell, 2001). Atualmente, os maiores fabricantes de rações para animais de laboratório nos Estados Unidos excluíram alfafa de suas formulações (Brown e Setchell, 2001).

Neste contexto, muitas chamadas de advertência sobre as conseqüências do consumo de soja têm sido publicadas em artigos científicos, bem como nos informativos para o público em geral (Clapauch et al., 2002).

1.4. CONSUMO DE FITOESTRÓGENOS

Homens e animais estão expostos a variadas doses de FE em todas as fases da vida ao consumirem leguminosas, em especial soja e seus derivados (Kurzer e Xu, 1997) e até mesmo leite (Franke et al., 1998, Fritz et al., 1998, King et al., 1998) e ovos (Saitoh et al., 2001).

Alimentos como soja tostada (35,2% de proteína), farinha de soja (37,8% de proteína), ou concentrados de proteína de soja apresentam entre 5,2 a 5,5 mg de isoflavonas por grama de proteína. Desta forma, uma porção de ½ copo de soja tostada (93g), quantidade normalmente recomendada para o consumo diário, contém 167 mg de isoflavonas (Reinli e Block, 1996).

A concentração de isoflavonas nas fórmulas infantis à base de soja varia de 155 a 281 mg/Kg. Crianças alimentadas com estes produtos estão expostas a doses de isoflavonas 4 a 6 vezes maiores do que adultos consumindo uma dieta contendo 30g de soja por dia (Franke et al., 1998). Esta exposição é da ordem de 22-45mg de isoflavonas/dia (6-11 mg/Kg/dia), o que gera concentrações sanguíneas de isoflavonas de 13.000 a 22.000 vezes maiores do que as concentrações de estradiol nas crianças mais jovens (Setchell et al., 1997, 1998). Este fato em especial tem despertado a atenção da classe científica, devido ao potente efeito estrogênico destes componentes, o que, teoricamente, pode causar efeitos permanentes (Irvine et al., 1998, Strom et al., 2001, Yellayi et al., 2002).

Níveis plasmáticos de isoflavonas excedendo em 30 a 60 mil vezes os níveis de estrogênios endógenos foram identificados em roedores após consumirem rações comerciais, cuja fonte protéica era derivada da soja (Brown e Setchell, 2001). Altos níveis de fitoestrógenos também foram observados em rações comercializadas para animais de companhia e roedores (Setchell et al., 1987, Thigpen et al., 1999, Brown e Setchell, 2001, Court e Freeman, 2002, Degen et al., 2002, Cerundolo et al., 2004). Pesquisadores devem estar atentos, pois a presença de grandes quantidades de FE nas dietas para animais de laboratório pode comprometer os resultados de investigações científicas (Casanova et al., 1999, Thigpen et al., 1999, Brown e Setchell, 2001).

1.5. MECANISMO DE AÇÃO DOS FITOESTRÓGENOS EM MACHOS

Até recentemente, pouco se conhecia sobre o mecanismo de ação dos estrogênios nos tecidos do macho. A enzima aromatase, responsável por catalisar a conversão de andrógenos em estrogênios foi identificada em várias células e tecidos, como células germinativas, inclusive espermatozóides, células intersticiais, células de sustentação (Hess et al., 2001) e no encéfalo, onde estrógenos derivados da aromatização intracerebral promovem o perfil masculino do desenvolvimento do sistema nervoso central (Register et al., 1995).

Os estrogênios exercem seus efeitos principalmente ligando-se aos receptores nucleares para estrogênios $RE\alpha$ e $RE\beta$, ativando a transcrição dos genes alvos (Setchell et al., 1984). Estes receptores foram localizados na cabeça e flagelo de espermatozóides (Adeoya-Osiguwa et al., 2003), células germinativas, células intersticiais, células de sustentação, no epitélio do epidídimo e principalmente no epitélio dos ductos eferentes (Couse et al., 2001). Uma série de investigações tem demonstrado severos distúrbios do comportamento sexual, significativa diminuição do número de espermatozóides, baixa taxa de motilidade, aumento de cabeças soltas e espermatozóides incapazes de fertilização em ratos $RE\alpha$ Knockout. Por outro lado, ratos $RE\beta$ knockout não apresentaram nenhuma aparente disfunção de fertilidade (Couse et al., 2001).

Como compostos estrogênicos, os FE também interagem com os receptores para estrogênio, particularmente com os $RE\beta$, exibindo efeitos agonistas ou antagonistas, dependendo do tecido envolvido (Miksicek, 1993, Casanova et al., 1999, Whitten et al.,

2002, Lephart et al., 2002), todavia possuem uma ação mais fraca, de 1/500 a 1/1000 vezes menores do que a do 17β -estradiol (Helmut e Greim, 2004). Nas concentrações de 100 a 1000 vezes maiores do que a de 17β -estradiol, níveis prováveis no plasma de homens que consomem fitoestrógenos regularmente, foi proposto que os fitoestrógenos competem efetivamente com os estrogênios endógenos e combinam-se com os receptores, prevenindo crescimentos estrógeno-dependentes (Adlercreutz et al., 1992). Também reduzem a exposição a estrogênios endógenos por estimular a produção da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) pelo fígado (Sharpe e Skakkebaek, 1993) e pela inibição da enzima aromatase (Kao et al., 1998).

Como efeito anti-androgênico, a genisteína inibe a enzima 5α -redutase, responsável pela conversão de testosterona em diidrotestosterona, que é mais potente (Evans et al., 1995) e a 3β -hidroxiesteróide dehidrogenase, enzima essencial para a síntese dos hormônios adrenocorticais e os esteróides sexuais (Ohno et al., 2003).

Os efeitos dos fitoestrógenos em fêmeas são mais evidentes, provavelmente devido ao número maior de receptores para estrogênios (Kurzer e Xu, 1997). Por esta razão, os concentrados de isoflavonas integraram os receituários médicos ginecologistas para aliviar sintomas da menopausa. Os potentes efeitos uterotrópicos e gonadotrópicos relatados por diversos autores podem ser acessados nas revisões de Whitten et al. (1993) e Kurzer e Xu (1997).

Somente aspectos da reprodução de machos foram focados neste trabalho, pois é onde pairam maiores incertezas e contradições. Em adição, há poucos ensaios explorando os reflexos da exposição a FE sobre a reprodução de machos (Kumi-Diaka et al., 1998,

Strauss et al., 1998, Mitchell et al., 2001, Faqi et al., 2004), principalmente de forma crônica e em doses similares às terapêuticas; ou dentro de limites razoáveis, compatíveis com a ingestão de soja. Este é o primeiro estudo sobre os efeitos decorrentes da exposição crônica a FE em coelhos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar se a exposição a isoflavonas da soja por via direta ou indireta (gestacional e lactacional) pode comprometer a saúde reprodutiva de coelhos machos.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a hipótese de que o consumo perinatal ou crônico de isoflavonas pode estar associado a efeitos deletérios nos aspectos reprodutivos de coelhos machos.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar (após exposição perinatal e crônica) se o consumo de ração comercial à base de proteína de soja, largamente utilizada na criação de animais, pode causar prejuízos à função reprodutiva no que se refere à morfologia dos órgãos reprodutivos, níveis séricos de testosterona, maturação e comportamento sexual, bem como à qualidade do sêmen de coelhos machos.
- Avaliar (após exposição perinatal e crônica) o efeito de diferentes níveis de isoflavonas da soja na forma de concentrados sobre os referidos aspectos reprodutivos de coelhos machos.

2. ARTIGOS

2.1. Efeitos da exposição perinatal a isoflavonas sobre a saúde reprodutiva de coelhos machos.

2.2. Cardoso, J. R., Bão, S. N. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. Anim. Reprod. Sci., v. 97, n. 3-4, p. 237-45, Feb. 2007.

2.3. Cardoso, J. R., Mondadori, R. G., Bianchini, E., Bão, S. N. Effects of chronic treatment with soy derived isoflavones on reproductive health of male rabbits. Biosc. J., v. 23, n.1, abril 2007.

2.1

Efeitos da exposição perinatal a isoflavonas sobre a saúde reprodutiva de coelhos machos

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição perinatal (gestacional e lactacional) a isoflavonas em dieta contendo soja ou na forma de concentrado de isoflavonas pode comprometer aspectos do desenvolvimento sexual de coelhos machos. Para tanto, 12 matrizes da raça Nova Zelândia Branco foram submetidas a um dos seguintes tratamentos: (1) dieta isenta de soja e alfafa (dieta controle), cuja fonte protéica derivou do farelo de algodão; (2) dieta contendo soja (S+); (3) dieta controle, suplementada com 10 mg/kg/dia de isoflavonas da soja (ISF 10) e, (4) dieta controle, suplementada com 20 mg/kg/dia de isoflavonas da soja (ISF 20). Parte da prole macho foi avaliada ao desmame, que ocorreu entre os 29 e 31 dias, quanto ao peso corporal, nível sérico de testosterona e grau de desenvolvimento dos testículos e epidídimos. Os demais machos foram mantidos na dieta controle e avaliados entre 15 e 27 semanas de idade, quanto ao comportamento sexual, qualidade do sêmen, peso corporal e dos órgãos sexuais e histopatologia dos testículos e epidídimos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no consumo de dieta pelas matrizes. Os órgãos do aparelho reprodutor avaliados apresentaram morfologia e peso compatíveis com o do grupo controle, tanto na fase de desmama, quanto

na puberdade. Os animais manifestaram comportamento sexual normal e características do sêmen também compatíveis estatisticamente com o observado no grupo controle. Pode-se concluir, portanto, que o consumo de dieta contendo soja ou concentrados de isoflavonas durante o período de gestação e lactação não compromete a gestação e o desenvolvimento sexual de coelhos machos.

Palavras-chave: fitoestrógenos, soja, isoflavonas, reprodução

Introdução

Um estudo realizado por Carlsen et al. (1992) reforçou a discussão sobre a saúde reprodutiva masculina. Segundo o mesmo, houve uma queda de aproximadamente 50% do número de espermatozóides de homens nas últimas 5 décadas. Apesar do contundente questionamento acerca da metodologia aplicada nesta meta-análise (Handeslman, 2001), outras investigações sustentam a hipótese por apontarem resultados similares em algumas regiões do planeta (Lerchl, 1995, Adamapoulos et al., 1996, Irvine et al., 1996, Andersen et al., 2000).

Tem-se relatado também maior incidência de outras desordens reprodutivas em homens e numa variedade de vertebrados, como criptorquidismo, hipospádia e câncer testicular (Sharpe e Skakkebaek, 1993, Carlsen et al., 1995, Boisen et al., 2001, Norgil Damgaard et al., 2002, Joffe, 2003, Wisniewski et al., 2003, Edward et al., 2006). Em

humanos, o desenvolvimento reprodutivo anormal pode se manifestar como um conjunto de sintomas, descritos coletivamente como síndrome da malformação testicular, descrita também como a desmasculinização ou feminização do fenótipo masculino (Boisen et al., 2001, Edward et al., 2006). Considerando que a maioria dos indivíduos que nascem com tais alterações não apresentam defeitos genéticos, esta síndrome pode ser resultado de alterações embriológicas e do desenvolvimento gonadal durante a vida fetal, induzidas pela exposição perinatal a químicos industriais e farmacêuticos, capazes de interferir no sistema endócrino (Helmut e Greim, 2004). Todavia, têm-se alertado para uma possível participação dos fitoestrógenos nestes eventos, onde atuando em fases críticas do desenvolvimento, poderiam constituir um fator primário ou secundário, neste último caso, como mediadores de efeitos aditivos aos efeitos de outros moduladores do sistema endócrino (Sharpe e Skakkebaek, 1993, Sharpe, 1993, Wisniewski et al., 2003).

A hipótese de que os FE poderiam prejudicar o desenvolvimento normal do aparelho reprodutor masculino está fundamentada por trabalhos *in vitro* e *in vivo* que demonstram sua capacidade de atuarem como estrogênios ou anti-estrogênios potentes, quando em maiores concentrações (revisado por Kurzer e Xu, 1997). Em adição, O Comitê Científico em Toxicologia, Ecotoxicologia e do Ambiente da Comissão Européia analisou as concentrações de disruptores endócrinos naturais e contaminantes químicos no plasma humano, e, a partir destas mensurações, inferiu a potência de cada composto junto ao receptor para estrogênio. Foi observado que a potência relativa dos tóxicos detectáveis no plasma humano, como o DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane), o 4-nonylphenol e o bisphenol é aproximadamente 1 milhão de vezes menor do que a do estradiol. Apenas a

isoflavona genisteína apresentou uma potência que excedeu a do estradiol (Helmut e Greim, 2004).

Apesar dos freqüentes questionamentos, há poucos estudos acerca das conseqüências da exposição perinatal a fitoestrógenos (Clapauch et al., 2002). Mais escassos em humanos, os estudos apontam resultados contraditórios. Existem evidências epidemiológicas e clínicas de que, atuando como estrogênios, os FE poderiam adiantar a puberdade e o desenvolvimento de mamas nas meninas antes dos 7 ou 8 anos e promover ginecomastia em meninos (revisado por Clapauch et al., 2002). Foi descrita maior incidência de hipospádia em 7.928 meninos examinados, cujas mães seguiram uma dieta vegetariana rica em FE durante a gravidez (North e Golding, 2000). Por outro lado, um estudo retrospectivo com 811 indivíduos que consumiram leite de vaca ou leite de soja na infância, não apontou diferenças entre os grupos quanto à maturação sexual, história reprodutiva, crescimento e peso na fase adulta (Strom et al., 2001). Como em humanos, estudos realizados com animais também não são decisivos para se aceitar ou refutar a hipótese de que a exposição perinatal a estes compostos poderiam comprometer o desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino.

Com a finalidade de acrescentar ao conhecimento acerca segurança da exposição a isoflavonas, este estudo teve como objetivo determinar se a exposição perinatal (gestacional e lactacional) a isoflavonas em dieta contendo soja ou ao concentrado de isoflavonas (10 e 20 mg/Kg/dia) pode comprometer aspectos do desenvolvimento sexual de coelhos machos.

Materiais e métodos

Animais e tratamentos

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Para avaliação das consequências da ingestão de fitoestrógenos durante gestação e lactação sobre a prole, foram utilizados 48 láparos machos, obtidos de 12 coelhas da raça Nova Zelândia Branco entre 8 e 24 meses, sendo que todas foram cobertas pelo mesmo reprodutor.

As fêmeas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos e submetidas durante a gestação e lactação a um dos seguintes tratamentos: (1) dieta isenta de soja e alfafa (dieta controle), cuja fonte protéica derivou do farelo de algodão; (2) dieta contendo soja (18% da matéria seca) (S+); (3) dieta controle, suplementada com 10 mg/kg/dia de isoflavonas da soja (Isoflavonas da Soja, 40%, DEG importação de produtos Químicos Ltda, São Paulo, SP) (ISF 10) e, (4) dieta controle, suplementada com 20 mg/kg/dia de isoflavonas da soja (ISF 20). A fim de se avaliar a equivalência nutricional das dietas, ao longo do experimento, amostras de ração de cada lote foram coletadas, misturadas e analisadas no laboratório de Análises de Alimentos da UPIS. O consumo médio diário de ração foi obtido pelo cálculo da quantidade fornecida e das sobras. As isoflavonas foram introduzidas diretamente na cavidade oral das coelhas. Para submeter as fêmeas dos outros tratamentos à situação similar, elas foram manipuladas de igual maneira e receberam amido de milho (Maizena®) como placebo.

Entre 29 e 31 dias de idade, parte dos láparos foi separada das mães. Destes, as fêmeas foram removidas do estudo e os machos, escolhidos aleatoriamente num total de 8

por tratamento, foram analisados de acordo com o seguinte protocolo: pesagem após jejum de 12 h (por separação das mães), anestesia com Zoletil 50® (Virbac) intramuscular, coleta de sangue e eutanásia por exsanguinação, remoção e pesagem em balança de precisão dos testículos e epidídimos, coleta de testículos e epidídimos esquerdos para exame histológico em microscopia de luz.

Quatro animais de cada grupo foram desmamados aos 35 dias de idade e continuaram no experimento para avaliação de parâmetros reprodutivos na fase adulta; porém, a partir da desmama, todos estes seguiram a mesma dieta do grupo controle.

Avaliações ao desmame

Avaliação dos órgãos do aparelho reprodutor masculino e dosagem de testosterona

A análise em microscopia de luz dos órgãos do aparelho reprodutor masculino contemplou os testículos e epidídimos esquerdos. Para tanto, estes órgãos foram fixados em solução de Bouin por um período de 06 horas, processados pelas técnicas de rotina, inclusão e corte em parafina e corados pela hematoxilina e eosina. Foram obtidos cortes longitudinais do testículo, cabeça e cauda do epidídimo. Para análise do grau de maturação testicular, foi mensurado o diâmetro dos túbulos seminíferos em 20 secções transversais de túbulos, escolhidos ao acaso e apresentando contorno o mais circular possível, considerando sempre seu menor diâmetro, segundo as técnicas descritas por Berndtson et al. (1989). Para obtenção destas medidas foi utilizada a objetiva de 40X. O mesmo

procedimento foi adotado para a avaliação do ducto epididimário, mas somente a circunferência delimitada pela membrana basal foi considerada para a mensuração de seu diâmetro.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1600 g por 8 minutos e estocadas a - 20° C para posterior análise dos níveis de testosterona pela técnica de quimioluminescência automatizada, segundo o protocolo do fabricante (equipamento ACS 180 Plus - Bayer).

Avaliação dos animais na puberdade

Evolução da espermatogênese e análise do sêmen

A partir das 15 semanas de idade começaram as tentativas de monta e ejaculação, que se estenderam semanalmente até as 21 semanas de idade. Para tanto, uma coelha era introduzida na gaiola do macho e lá mantida até a cobertura e coleta do sêmen, caso houvesse cópula, ou até 3 minutos no caso de indiferença sexual. Este procedimento permitiu avaliar a evolução da espermatogênese e a idade da manifestação da libido. O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial conforme o método descrito na literatura (Andrade et al., 2002).

Na 26ª semana, os coelhos foram submetidos a uma coleta de sêmen em 3 dias alternados. Imediatamente após cada coleta, o volume da fração líquida do sêmen foi medido em tubo graduado. Para a determinação da motilidade (0-100%) e do vigor da motilidade (0-5), uma gota de sêmen foi adicionada a uma gota de solução salina

previamente aquecida sobre uma lâmina histológica em contato com a placa de aquecimento elétrica a 37° C. A avaliação foi realizada em microscópio de luz (400X). A contagem de espermatozoides foi realizada em câmara hematóimétrica de Neubauer (BmbH + Co., Brandstwierte 4, 2000 Hamburg 11, Germany), após diluição do ejaculado em solução salina de formol a 4% na proporção de 1:100. Foram realizadas duas contagens por amostra em microscópio de luz (400X).

Comportamento sexual

O comportamento sexual foi avaliado por meio de parâmetros objetivos, que incluíram a mensuração do tempo de reação (em segundos), do reflexo de monta (em dias) e do intervalo entre duas ejaculações consecutivas na vagina artificial (em segundos).

O tempo de reação (período compreendido entre a introdução da fêmea na gaiola e a monta) foi obtido nas 3 coletas de sêmen da 26ª semana. O intervalo entre duas ejaculações consecutivas na vagina artificial foi obtido na última das 3 coletas de sêmen. A idade em que os machos manifestaram o reflexo de monta foi avaliada nas tentativas de coleta de sêmen entre a 15ª e 21ª semanas de idade. Este parâmetro indica a idade em que o animal manifesta libido através da monta, seguida de penetração e ejaculação.

Análise dos órgãos e tecidos

Na 27ª semana, os animais foram sacrificados por exsanguinação após anestesia com tiopental (Thiopental®). O protocolo seguiu o referido quanto à avaliação ao desmame.

Testículos, epidídimos, pré-próstata e próstata foram removidos, pesados e processados para análise em microscopia de luz quanto à integridade estrutural.

Análise estatística

Os resultados dos parâmetros avaliados foram analisados usando ANOVA, e os valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. O grupo S+ foi comparado somente com o grupo controle, uma vez que duas variáveis o difere dos demais tratamentos; o nível e fonte de isoflavonas. As análises foram realizadas no programa SAS System for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Resultados

Análises do pool de amostras das rações coletadas ao longo do período de tratamento indicaram que as mesmas apresentaram níveis equivalentes de matéria seca (86,57% para dieta formulada com farelo de soja e 88,82% para dieta formulada com farelo de algodão) e de proteína bruta (15,68% para a ração com farelo de soja e 15,16% para a ração com farelo de algodão).

Características das matrizes quanto ao consumo de alimentos e desempenho reprodutivo

A dieta à base de proteína de soja ou a exposição a concentrados de isoflavonas durante a gestação e lactação não interferiu em aspectos relacionados ao consumo de

alimento pelas matrizes, bem como no período de gestação e tamanho das ninhadas (Tab. 1).

Avaliação dos láparos machos

Órgãos reprodutores

Aos 30 dias de idade, já foi possível observar nos testículos o esboço tubular, com contorno definido e distinto do interstício adjacente, sem aparente diferença entre os tratamentos (Fig. 1). O lúmen tubular não foi contemplado em nenhum dos tratamentos nesta fase. Já o ducto epididimário apresentava nesta fase lúmen em todas as secções e epitélio cúbico simples, sem evidências de pseudoestratificação. O estágio de desenvolvimento destes órgãos obedeceu ao fator etário, não havendo nenhuma aparente influência dos tratamentos em questão, tanto em relação ao desenvolvimento, quanto em relação à ausência de alterações histopatológicas. As mensurações obtidas nestes órgãos, assim como os níveis séricos de testosterona não apontaram nenhuma diferença significativa entre os tratamentos (Tab. 2).

Avaliação dos animais na fase adulta

Quatro animais de cada tratamento foram mantidos a partir dos 35 dias de idade na dieta controle para avaliação posterior. Destes, um animal do grupo ISF 10 faleceu por pleuropneumonia, devido a provável lesão numa ponta da grade da gaiola; não havendo, portanto, relação com o tratamento.

O reflexo de monta, como indicativo do início da manifestação do interesse sexual se deu em idade compatível com o descrito na literatura para esta raça, não havendo diferenças entre os tratamentos (Tab. 3). Na 26ª semana, foram realizadas 3 coletas de sêmen de cada animal em dias alternados. Os resultados da avaliação destas amostras, bem como do comportamento sexual durante as coletas não refletiu comprometimento destes aspectos entre os grupos estudados (Tab. 3).

A análise dos tecidos em microscopia de luz não revelou alterações histopatológicas nos órgãos do aparelho genital masculino. Conforme pode ser observado na figura 2 para pré-próstata.

Discussão

Isoflavonas estão presentes na alimentação animal e humana, cuja fonte protéica encerra soja (Thigpen et al., 1999). A transferência de ISF pela placenta e pela amamentação são duas vias comprovadas de exposição de homens e animais a estes agentes (Franke e Custer, 1996, Franke et al., 1998, King et al., 1998, Doerge et al., 2001, Norgil Damgaard et al., 2002). A proporção de isoflavonas absorvida da alimentação e a que é transferida pela placenta ainda não foram descritas em coelhos. Em humanos, a excreção fecal de isoflavonas é de apenas 1 a 2 % da quantidade ingerida, o que indica que a absorção é quase completa (Xu et al., 1994). Níveis plasmáticos de isoflavonas em ratos neonatos, cujas mães foram alimentadas com ração contendo soja, podem chegar a 25% da concentração plasmática materna (Brown e Setchell, 2001). Os níveis de genisteína no

cérebro fetal são equivalentes aos encontrados no cérebro materno de ratas após receberem este composto (Doerge et al., 2001).

A avaliação dos láparos na desmama, como proposto neste estudo é justificado pelo fato de que alguns efeitos decorrentes da exposição à fitoestrógenos são transitórios, podendo ser evidenciados nas fases iniciais do desenvolvimento e desaparecer com o aumento da idade (Roberts et al., 2000, Wisniewski et al., 2003). Os resultados deste estudo conduzido em coelhos sustentam as evidências constatadas em estudos desenvolvidos em roedores. Fielden et al. (2003) não observaram nenhum efeito deletério nos aspectos reprodutivos de machos expostos a genisteína (doses entre 0,1 e 10 mg/Kg/dia) durante a gestação e lactação, similar ao observado por Casanova et al. (1999) em ratos Sprague-Dawley aos 21 dias de idade, tendo as reprodutoras consumido dieta contendo soja ou genisteína (0,02 e 0,1% da dieta). De forma similar, há uma aparente ausência de efeitos clínicos como feminização em crianças expostas a altas doses de fitoestrógenos por consumirem fórmulas a base de soja (Essex, 1996).

Teoricamente, fetos e neonatos são mais susceptíveis aos efeitos dos fitoestrógenos (Sharpe e Skakkebaek, 1993, Makela et al., 1995, Irvine et al., 1998), e é justamente na fase fetal que deve ocorrer uma maior exposição a estes compostos, devido ao acúmulo pré-natal de isoflavonas transferidas pela placenta durante a gestação (Brown e Setchell, 2001). Entretanto, constatações deste estudo em coelhos e dos estudos descritos acima em ratos não sustentam esta teoria. Segundo Essex (1996), isto pode ser justificado pelo fato de que o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é mais ativo em jovens do que em adultos, e, portanto, mais refratário a efeitos externos.

Uma série de investigações tem demonstrado severos distúrbios do comportamento sexual, significativa diminuição do número de espermatozóides, baixa taxa de motilidade, aumento de cabeças soltas e espermatozóides incapazes de fertilização em ratos RE α Knockout. Por outro lado, ratos RE β knockout não apresentaram nenhuma aparente disfunção de fertilidade (Couse et al., 2001). Como os fitoestrógenos têm maior afinidade pelos receptores β , este fato também pode estar envolvido com a aparente ausência de efeitos agonista em coelhos.

Pode se concluir, portanto, que o consumo de concentrados de isoflavonas (em níveis até 20 vezes superiores aos prescritos para alívio dos sintomas da menopausa), ou dieta contendo soja durante o período de gestação e lactação não compromete a gestação, o tamanho da ninhada e o consumo de dieta pelas matrizes. Da mesma forma, o desenvolvimento sexual da prole macho, exposta indiretamente a estes compostos por via placentária e pela amamentação não foi comprometida, como constatado pela ausência de alterações que remetem à síndrome da malformação testicular; pelo desenvolvimento normal dos órgãos genitais; pelas características do sêmen e pelo comportamento sexual.

Agradecimentos

À UPIS – Faculdades Integradas, pelo auxílio financeiro, disponibilização das instalações, funcionários e laboratórios; e à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Referências bibliográficas

Adamopoulos, D. A., Pappa, A., Nicopoulou, S., Andreou, E., Karamertzanis, M., Michopoulos, J., Deligianni, V., Simou, M. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod.*, v. 11, n. 9, p. 1936-41, 1996.

Andersen, A. G., Jensen, T. K., Carlsen, E., Jorgensen, N., Andersson, A. M., Krarup, T., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum. Reprod.*, v. 15, n. 2, p. 366-72, 2000.

Andrade, A. F. C., Yonezawa, L. A., Celeghini, E. C. C., Spers, A., Arruda, R. P. Um novo modelo de vagina artificial para coelhos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, n. 3, p. 201-4, 2002.

Berndtson, W. E., Neefus, C., Foote, R. H., Amann, R. P. Optimal replication for histometric analyses of testicular function in rats or rabbits. *Fundam. Appl. Toxicol.*, v. 12, n. 2, p. 291-302, 1989.

Boisen, K. A., Main, K. M., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E. Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 948, p. 90-9, 2001.

Brown, N., M., Setchell, K., D., R. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab. Invest.*, v. 81, n. 5, p. 735–47, 2001.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, E. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.*, v. 305, n. 6854, p. 609-13, 1992.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ. Health Perspect.*, v. 103, Suppl 7, p. 137-9, 1995.

Casanova, M., You, L., Gaido, K. W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D. B., Heck, H. A. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta *in vitro*. *Toxicol. Sci.*, v. 51, n. 2, p.236-44, 1999.

Clapauch, R., Meirelles, R. M. R., Julião, M. A. S. G., Loureiro, C. K. C., Giarodoli, P. B., Pinheiro, S. A., Harrigan, A. R., Spritzer, P. M., Pardini, D. P., Weiss, R. V., Athayde, A., Russo, L. A., Pova, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do departamento de endocrinologia feminina da sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia (SBEM). *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, n. 6, p. 679-95, 2002.

Couse, J. E., Mahato, D., Eddy, E. M., Korach, K. S. Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 13, n. 4, p. 211-9, 2001.

Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R. R., Delclos, K. B. Placental transfer of the soy genisteína following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod. Toxicol.*, v. 15, n. 2, p. 105-10, 2001.

Edwards, T. M., Moore, B. C., Guillette Jr., L. J. Reproductive dysgenesis in wild life: a comparative view. *Int. J. Androl.*, v. 29, n. 1, p. 109-21, 2006.

Essex C. Phytoestrogens and soy based infant formula. *Br. Med. J.*, v. 313, n. 7056, p. 507–508, 1996.

Fielden, M. R., Samy, S. M., Chou, K. C., Zacharewski, T. R. Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. *Food. Chem. Toxicol.*, v. 41, n. 4, p. 447-54, 2003.

Franke, A. A., Custer, L. J. Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clin. Chem.*, v. 42, n. 6, p. 955-64, 1996.

Franke, A. A., Custer, L. J., Tanaka, Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 68, n. 6, p. 1466-73, 1998.

Handeslman, D. J. Estrogens and falling sperm counts. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 13, p. 317-24, 2001.

Helmut, A., Greim, M. D. The endocrine and reproductive system: Adverse effects of hormonally active substances? *Pediatrics*, v. 113, n. 4, p. 1070-75, 2004.

Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., MacDonald, E., Aitken, J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Brit. Med. J.*, v. 312, n. 7029, p. 467-471, 1996.

Irvine, C. H., Fitzpatrick, M. G., Alexander, S. L. Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 217, n. 3, p. 247-253, 1998.

Joffe, M. Infertility and environmental pollutants. *Br. Med. Bull.*, v. 68, p. 47-70, 2003.

King, R. A., Bursill, D. B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 67, n. 5, p. 867-72, 1998.

Kurzer, M. S., Xu, X. Dietary phytoestrogens. *Rev. Nutr.*, v. 17, p. 353–81, 1997.

Lerchl, A. Evidence for decreasing quality of sperm. Presentation of data on sperm concentration was flawed. *Brit. Med. J.*, v. 311, n. 7004, p. 569-70, 1995.

Makela, S., Santti, R., Salo, L., McLachlan, J. A. Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ. Health Perspect.*, v. 103, Suppl 7, p. 123-7, 1995.

Norgil Damgaard, I., Main, K.M., Toppari, J., Skakkebaek, N. E. Impact of exposure to endocrine disrupters in utero and in childhood on adult reproduction. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 16, n. 2, p. 289-309, 2002.

North, K., Golding, J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC study team. *Avon longitudinal study of pregnancy and childhood. Brit. J. Urol. Int.*, v. 85, n. 1, p. 107-13, 2000.

Roberts, D., Veeramachaneni, D. N., Schlaff, W. D., Awoniyi, C. A. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine*, v. 13, n. 3, p. 281-86, 2000.

Sharpe, R. M. Falling sperm counts in men – is there an endocrinologic cause? *J. Endocrinol.*, v. 137, n. 3, p. 357-60, 1993.

Sharpe, R. M., Skakkebaek, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, v. 341, p. 1392-95, 1993.

Strom, B. L., Schinnar, R., Ziegler, E. E., Barnhart, K. T., Sammel, M. D, Macones, G. A., Stallings, V. A., Drulis, J. M., Nelson, S. E., Hanson, S. A. Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA*, v. 286, n. 7, p. 807-14, 2001.

Thigpen, J. E., Setchell, K. D., Ahlmark, K. B., Locklear, J., Spahr, T. Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab. Anim. Sci.*, v. 49, n. 5, p. 530-36, 1999.

Wisniewski, A. B., Klein, S. L., Lakshmanan, Y., Gearhart, J. P. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *J. Urol.*, v. 169, n. 4, p. 1582-86, 2003.

Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., Cook, L., Hendrich, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J. Nutr.*, v. 124, n. 6, p. 825-32, 1994.

Tabela 1. Características das matrizes submetidas a tratamento com isoflavonas e ao consumo de ração à base de proteína de soja te a gestação e lactação.

Característica	Controle	ISF 10	ISF 20	S+
Consumo de ração durante a gestação ¹ (g/dia)	147,0 (6,0)	145,4 (9,2)	142,6 (3,0)	151,2 (9,4)
Consumo de ração durante a lactação ² (g/dia)	197,0 (9,0)	200,5 (10,0)	195 (10,0)	205,0 (7,5)
Gestação (dias)	31,0 (0,8)	31,2 (0,9)	30,8 (0,7)	31,0 (0,8)
Ninhada	6,2 (2,0)	5,75 (0,9)	5,8 (1,3)	6,5 (0,8)

Resultados apresentados como média e desvio padrão. Diferenças não foram significativas.

($P > 0,05$). ¹ – Média de consumo na 2^a quinzena de gestação, ² – Média de todo o período de lactação. ISF 10: receberam 10 mg/Kg/dia de isoflavonas, ISF 20: receberam 20 mg/Kg/dia de isoflavonas, S+: alimentados com ração à base de farelo de soja.

Tabela 2. Peso relativo dos testículos e epidídimos, diâmetro de túbulos seminíferos e ducto epididimário e níveis de testosterona de láparos machos entre 29 e 31 dias de idade expostos a isoflavonas no período perinatal.

Característica	Controle	ISF 10	ISF 20	S+
Peso corporal (PC)	592,5 (56)	596,0 (22)	594,6 (26)	608,5 (35)
Testículos/PC (mg/g)	0,115 (0,0)	0,116 (0,0)	0,114 (0,0)	0,114 (0,0)
Epidídimos/PC (mg/g)	0,77 (0,0)	0,76 (0,0)	0,78 (0,0)	0,76 (0,0)
Túb. seminíferos (µm)	59,7 (1,8)	58,3 (2,0)	59,0 (1,5)	61,4 (2,4)
Ducto epidídimo (µm)	65,8 (2,7)	65,5 (1,5)	63,7 (1,5)	66,3 (1,9)
Testosterona (ng/dl)	67,64 (4,0)	65,8 (8,9)	62,6 (7,0)	64,1 (8,5)

Resultados apresentados como média e desvio padrão. Diferenças não foram significativas ($P > 0,05$). ISF 10: receberam 10 mg/Kg/dia de isoflavonas, ISF 20: receberam 20 mg/Kg/dia de isoflavonas, S+: alimentados com ração à base de farelo de soja. PC – peso corporal.

Tabela 3. Características do sêmen, comportamento sexual, peso corporal e dos órgãos reprodutivos de coelhos adultos expostos a isoflavonas no período perinatal.

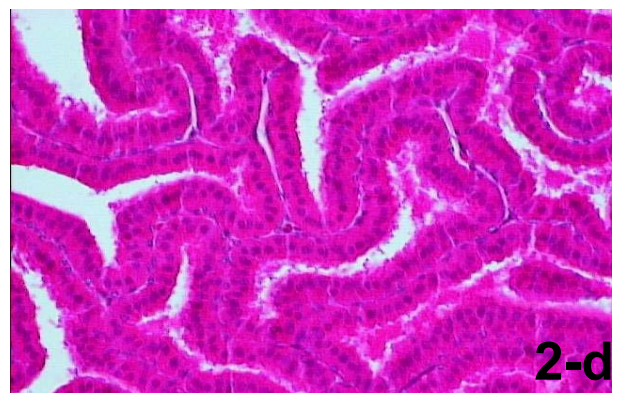
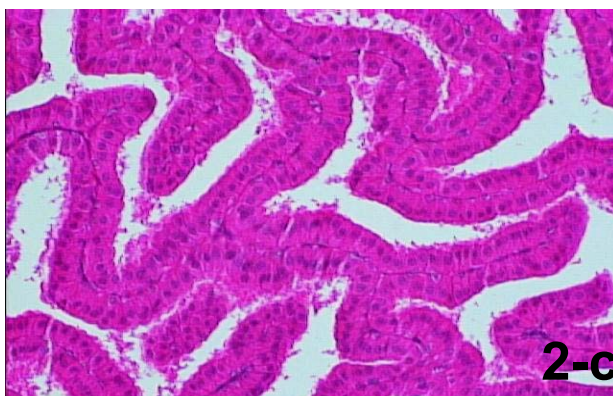
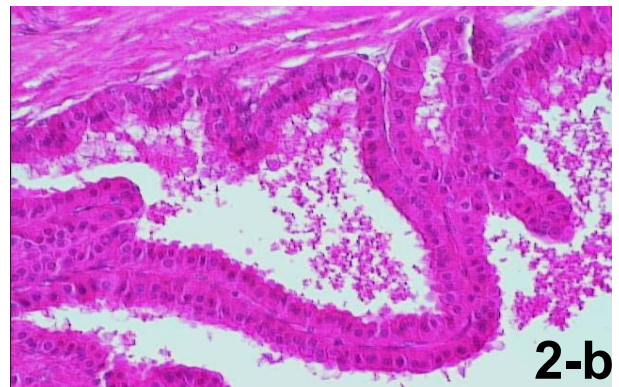
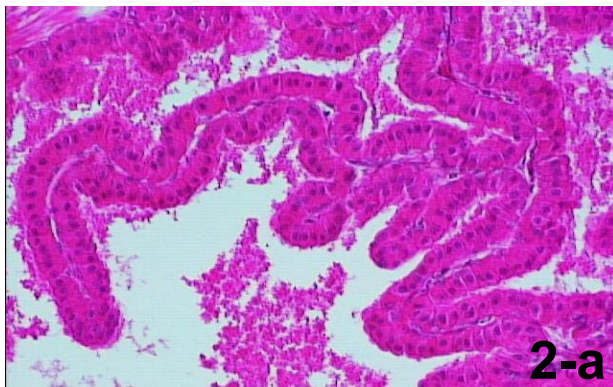
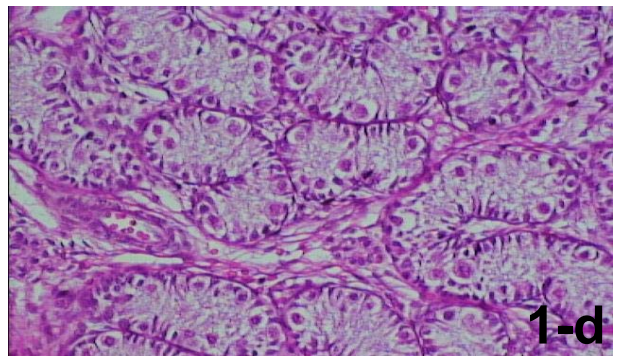
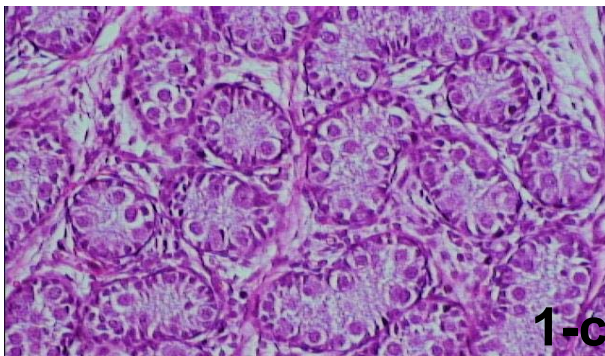
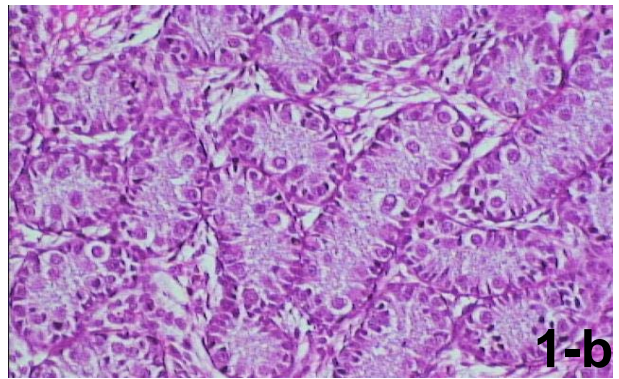
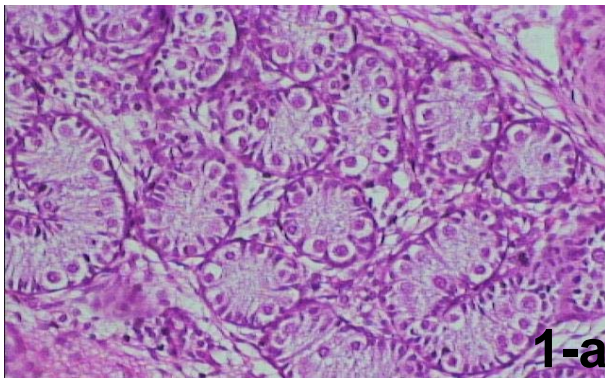
Característica	Controle	ISF 10	ISF 20	S+
Volume (ml)	0,53 (0,0)	0,54 (0,0)	0,52 (0,0)	0,52 (0,0)
Concentração (x10 ⁶ /ml)	242,75 (22)	250,6 (26)	248,2 (12)	246,2 (26)
Total de spz/ejaculado	128,6 (11)	134,26 (10)	129,5 (3)	130,0 (15)
Motilidade (%)	76,2 (2,6)	77,3 (4,5)	76,7 (4,0)	79,5 (1,3)
Vigor (0-5)	3,5 (0,1)	3,5 (0,2)	3,4 (0,1)	3,3 (0,2)
Reflexo de monta (dias)	118,7 (3,5)	120 (0,0)	116,5 (4,0)	116,5 (4,0)
Tempo de reação (seg.)	4, 3 (0,2)	4,6 (0,2)	4,3 (0,2)	4,5 (0,3)
Intervalo montas (seg.)	111,7 (15)	119,0 (21)	114,7 (19)	106,0 (16)
Peso corporal (PC) (g)	3595 (104)	3566 (117)	3592 (135)	3547 (75)
Consumo de alimento ¹ (g)	112,7 (5,4)	111,3 (7,1)	112,7 (5,9)	108,2 (4,6)
Testículos/PC (mg/g)	1,55 (0,0)	1,54 (0,0)	1,54 (0,0)	1,53 (0,0)
Epidídimos /PC (mg/g)	0,64 (0,0)	0,61 (0,0)	0,64 (0,0)	0,63 (0,0)
Próstata/PC (mg/g)	0,193 (0,0)	0,194 (0,0)	0,194 (0,0)	0,191 (0,0)
Pré-próstata/PC (mg/g)	0,191 (0,0)	0,190 (0,0)	0,193 (0,0)	0,189 (0,0)

Resultados apresentados como média e desvio padrão. ¹ Consumo obtido pela media diária durante a 25^a e 26^a semana de idade. ISF 10: receberam 10 mg/Kg/dia de isoflavonas, ISF 20: receberam 20 mg/Kg/dia de isoflavonas, S+: alimentados com ração à base de farelo de soja. Diferenças não foram significativas ao nível de 5%.

Legendas das figuras.

Figura 1. Testículos de coelhos aos 30 dias de idade. Tratamentos: a) Controle, b) ISF 10 (10 mg/kg/dia de isoflavonas da soja), c) ISF 20 (20 mg/kg/dia de isoflavonas da soja), d) S+ (tratados com ração à base de soja). H.E., 200X.

Figura 2. Pré-próstata de coelhos com 27 semanas de idade. Tratamentos: a) Controle, b) ISF 10 (10 mg/kg/dia de isoflavonas da soja), c) ISF 20 (20 mg/kg/dia de isoflavonas da soja), d) S+ (tratados com ração à base de soja). H.E., 200X.



Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits

J.R. Cardoso^{a,b,*}, S.N. Báo^c

^a *Institute of Biological Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil*

^b *Department of Veterinary Medicine, UPIS, Faculdades Integradas, SEPS 712/912, Brasília, DF 70390-125, Brazil*

^c *Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil*

Received 19 September 2005; accepted 25 January 2006

Available online 13 March 2006

Abstract

Soy and derivative diets deliver large doses of isoflavones to human and animals throughout their lifespan, including gestation. Epidemiologic and experimental data suggest that the consumption of soybean containing foods may protect against cardiovascular disease and decrease breast, prostate and endometrial cancer risk. Based on animal and in vitro studies, however, concerns have been raised that consumption of isoflavones may cause potential adverse effects on the reproductive tract and behavior. The aim of this study was to investigate the effects of chronic consumption of a soy meal containing diet or soy isoflavones supplement on the morphology of reproductive organs, semen quality, age that males reached puberty, and sexual behavior of male rabbits. With this purpose, 16 female rabbits were randomly assigned to receive: (1) a soy- and alfafa-free diet; (2) a soy- and alfafa-free diet supplemented with 5 mg/kg body wt./day of soy isoflavones; (3) a soy- and alfafa-free diet supplemented with 20 mg/kg body wt./day of soy isoflavones; (4) a diet containing 18% of soy meal, throughout the gestation and lactation. After weaning, male offspring received the same diet, which was given to the respective mother. The age that males reached puberty, semen characteristics and sexual behavior were evaluated in these animals. At 33 weeks of age, the reproductive organs were submitted to histological evaluation. Rabbits, which received large amounts of isoflavones (20 mg/kg body wt./day) had a lesser food intake, body weight and semen volume. Spermatogenesis, morphology of male genital organs and sexual behavior did not differ significantly from the control group. We conclude that chronic dietary treatment with soy based diet or soy isoflavones have no adverse effects on the observed reproductive patterns of male rabbits.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phytoestrogens; Isoflavones; Soy; Reproduction; Rabbits

* Corresponding author. Tel.: +55 61 34889931; fax: +55 61 34889907.

E-mail address: julio01963@upis.br (J.R. Cardoso).

1. Introduction

Phytoestrogens (PE) are estrogenic compounds found in plants (Kurzer and Xu, 1997). They can be divided into three main classes: isoflavones (derived principally from soybeans and clover), coumestans (derived from sprouting plants, like alfafa) and lignans (found in flaxseed). In the isoflavone group, genistein and daidzein are thought to exert the most potent estrogenic hormone activity, and thus, most of the research efforts have been directed toward these molecules (Lephart et al., 2002).

Soy meal is a protein source commonly used and is commercially available for laboratory and farm animal diets, therefore, animals ingesting these diets are continually exposed to these hormonally active compounds (Lephart et al., 2002). Serum isoflavone concentrations exceeding the endogenous estrogen concentrations by 30,000–60,000-fold were observed in rodents fed commercial rodent diets (Brown and Setchell, 2001). The newborn rat pups showed about 25% of maternal isoflavone concentrations that were maintained throughout the suckling period.

Diets of other animal species contain large amounts of PE such as those detected in commercial chow of cats (Setchell et al., 1987; Court and Freeman, 2002), dogs (Cerundolo et al., 2004) and rodents (Thigpen et al., 1999; Brown and Setchell, 2001; Degen et al., 2002) with the protein source being soy meal. These findings indicate that all investigators should be vigilant to the PE composition of laboratory animal diets because these agents might have a direct effect on the outcome of bioassays designed to detect developmental toxicity or carcinogenicity (Casanova et al., 1999; Thigpen et al., 1999; Brown and Setchell, 2001).

There are few reports in literature regarding the effects of plant estrogens on reproductive health in males (Strauss et al., 1998; Mitchell et al., 2001; Faqi et al., 2004), especially in breeding or livestock animals. This is the first study to examine the effects of chronic dietary treatment with soy isoflavones on the reproductive tract of male rabbits.

The aim of the present study was to investigate the effects of the chronic dietary treatment with soy containing components or soy isoflavone supplements on: (1) morphology of the reproductive organs; (2) semen quality; (3) age of puberty; (4) sexual behavior of male rabbits.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Prior to study initiation, the experimental protocol was reviewed and approved by the University of Brasília Institute of Biological Sciences Ethical Committee to Animal Use. One male New Zealand and 16 female rabbits between 8 and 10 months of age were housed individually in steel cages equipped with automatic watering systems. Animals were kept on natural photoperiod and environmental temperature.

2.2. Treatments

Does were randomly divided into four equal groups of four rabbits each. Each group was subjected to one of the following treatments: (1) soy and alfafa free diet (S–); (2) soy and alfafa free diet supplemented with 5 mg/kg body wt./day of soy isoflavones (ISF 05); (3) soy and alfafa free diet supplemented with 20 mg/kg body wt./day of soy isoflavones (ISF 20) (Soy Isoflavones, 40%, DEG Importação de Produtos Químicos Ltda, São Paulo, SP); and (4) diet containing 18%

of soy meal (S+). Based on data from compendiums of isoflavone content in soybean-based foods (Reinli and Block, 1996), this diet provided about 13 mg/kg body wt./day of isoflavones.

The animals of other groups received similar portions of corn starch as placebo. The proper dose of isoflavones as well as placebo was inserted directly into the oral cavity after rabbit immobilization. The four groups received water and food ad libitum.

The diets (Nutrimais Rações®, Uberlândia, MG) contained similar nutritional amounts of other nutrients, but the protein source used in S– and ISF treatments was cottonseed meal. The diet used in the treatment 4 (S+) is a commercially available diet, similar to other diets commonly employed in rabbit feeding. The bromatological analyses to verify the nutritional values of the diets were assayed by Food Analysis Laboratory of UPIS (Brasília, Brazil).

The dams were mated with the same buck. At the 5th week of post birth, male offspring were numbered and surplus pups were randomly excluded from the study. The other 10 pups of each treatment received the same treatments from weaning (5 weeks) to 33 weeks of age. These animals were thus subjected to gestational, lactational, and post-lactational diets containing the various amounts of soy isoflavones.

Throughout the dietary treatment period, all animals were monitored daily for health status. Body weights and food consumption were measured weekly throughout the experimental period.

2.3. Ejaculates collection and evaluation

The artificial vagina (AV) for semen collection was built of polyvinyl chloride conduit (45 mm length, 15 mm diameter and 2 mm thickness), rubber condom for human semen collection (Microtex, INAL, Jaboticabal, SP, Brazil), two rubber bands, and a graduated collector tube. For the AV mounting, the blind sack of the condom was removed; its edges were folded over the borders of the rigid tube and attached by means of the rubber bands. Before the attachment of the second edge, the space between the rigid (external) and flexible (internal) tubes was filled with warm water (60 °C). The AV was always used just when inner temperature fell between 45 and 50 °C (Andrade et al., 2002). The collection tube was attached onto one of the edges, and the free edge was positioned to penis intromission. Before semen collection, bucks were allowed one false mount and at the subsequent mounting, the AV was adequately positioned for penis intromission. Bucks adapted easily to this routine and no refusals occurred.

From 100 to 170 days of age, semen samples were collected once a week to evaluate sexual maturation. After this initial period, the animals were collected every other day for 5 weeks, a total of 17 collections. The first seven samples were used to stabilize sperm output and were not included in the analysis, so the daily sperm output was quantified using the last 10 ejaculates.

After removing and weighing the gel mass, ejaculate volume was recorded in a graduated tube attached to the artificial vagina. Immediately after ejaculation, a semen and a saline drop was mixed on a heated (37 °C) slide under a cover slip for sperm motility (0–100%) and vigor (0–5) evaluation (light microscope, 400×). For determination of sperm concentration, ejaculates were diluted 1:100 in a 4% formol/0.9% saline solution and counted twice in Neubauer haemocytometer slide (GmbH + Co., Brandstwierte 4, 2000 Hamburg 11, Germany) using a light microscope (400×). The sperm morphology was examined on slides stained with Congo red and Gentian violet solutions.

2.4. Age that males reached puberty

The age at puberty was considered when semen characteristics reached concurrently the following values: sperm concentration over 75×10^6 sperm/ml, overall motility over 50% and vigor

of motile sperm over 2.5. These values were established for the present study. The ages (in days), which males showed ejaculates within these values were used for data analysis.

2.5. Sexual behavior

For sexual behavior analysis, measurements for time of reaction (latency to begin mounting); the interval between two consecutive ejaculations into the artificial vagina; and the mounting reflex were taken.

The mounting reflex as indicative of manifestation of sexual interest was considered when rabbits were capable of mounting and completing copulation, even if mature semen characteristics were not present. The ages (in days), which males exhibited the mounting reflex were used for data analysis.

The time of reaction was recorded from the time of subjecting a doe to the buck and mounting; it was measured in seconds using a stopwatch. The interval between two consecutive ejaculations into the artificial vagina was also measured (in seconds) after the analysis period was concluded. Values significantly greater or lesser than those from the control group indicate decreased or increased libido, respectively.

2.6. Tissue collection and evaluation

At 230 (± 3) days of age, males were killed via jugular exsanguination, after barbiturate anesthesia. Testes, epididymides, prostate and prostate glands were dissected and weighed. For histopathological evaluation, organ fragments were fixed in Bouin's solution followed by dehydration in 50% and 70% ethanol. After fixation, the tissue fragments were embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m in size and stained with hematoxylin and eosin. The sections were carefully examined for the presence of abnormalities.

2.7. Statistical methods

Comparisons between S+ and S− (control) groups were performed using analysis of variance (ANOVA), as all data had normal distribution. Comparisons among ISF 05, ISF20 and S− (control) groups were made using ANOVA (also data had normal distribution); when statistically significant ($P < 0.05$) intergroup differences were identified by ANOVA, post hoc analysis were assessed using a means test (Tukey's test). Values were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were carried out using the Statistical Analysis System Software (version 8.2; 1999).

3. Results

3.1. Health and growth evaluations

Chronic dietary treatment with soy based diet or soy isoflavones in rabbits induced no mortality or evidence of gross toxicity that was identifiable by clinical or physical observations.

3.2. Effects of chronic dietary treatment with soy-based diet or isoflavone supplements

3.2.1. Age that males reached puberty

The sexual maturation of the bucks occurred at ages compatible with breed standards and regional bioclimatological conditions, however, data indicated that soy meal-dietary treat-

Table 1

Effects of soy meal containing diet (S+) or soy isoflavones supplement (05 and 20 mg/kg BW/day) on semen characteristics of rabbits

Variable	S– (Control)	ISF 05	ISF 20	S+
Volume (ml)	0.54 ± 0.0 a	0.48 ± 0.0 ab	0.44 ± 0.0 b	0.50 ± 0.0 ns
Motility (%)	77.5 ± 1.3 a	80.8 ± 0.9 a	76.9 ± 1.7 a	77.3 ± 1.0 ns
Vigor (0–5)	3.1 ± 0.1 b	3.1 ± 0.1 b	3.4 ± 0.0 a	3.1 ± 0.0 ns
Abnormal sperm (%)	25.3 ± 1.2 a	23.3 ± 1.0 ab	21.2 ± 1.2 b	23.3 ± 1.6 ns
Sperm concentration (×10 ⁶ /ml)	197.1 ± 11.2 b	208.3 ± 5.2 ab	237.8 ± 9.6 a	227.5 ± 15.0 ns
Daily sperm output DSO (×10 ⁶)	104.7 ± 5.0 a	99.9 ± 1.6 a	104.6 ± 5.0 a	113.7 ± 7.3 ns

Values are given as mean ± S.E.M. of 10 ejaculates, $n = 10$ /group. Rows with different letters differ significantly ($P < 0.05$; Tukey's test). ns, Differences were not significant from S– ($P > 0.05$; ANOVA). Statistically significant difference from S– value ($P < 0.05$; ANOVA).

ment of rabbits resulted in more precocious males as compared with the control (S–) group (145.2 ± 2.1 S–; 131.6 ± 2.0 days of age S+; $P < 0.05$). There were no significant differences among ISF 05 (138.5 ± 1.7), ISF 20 (139.7 ± 1.3) and S– (145.2 ± 2.1 days of age) groups.

3.2.2. Semen quality

To reduce the influence of other variables, results of the semen characteristics among the treatments were based on data obtained from the evaluation of 400 semen samples. The values are summarized in Table 1. Rabbits in the ISF 20 group had smaller semen volume than rabbits in the S– (control) group ($P < 0.01$). Ejaculate semen volume of the animals in the (S+) or ISF 5 groups did not differ significantly from that of animals in the S– group. Although sperm concentration was found to be greater in the ISF 20 than in the S– group, daily sperm output (DSO) did not statistically differ from the S– group (Fig. 1, Table 1). The percentage of motile sperm did not differ significantly from S–, but sperm vigor was improved in rabbits with isoflavone treatment at 20 mg/kg body wt./day ($P < 0.01$). The percentage of abnormal sperm was less in the semen samples of the ISF 20 group ($P < 0.05$).

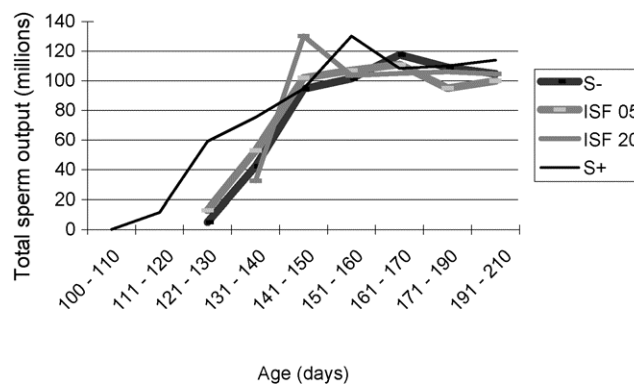


Fig. 1. Sperm production in rabbits fed soy meal containing diet (S+), supplemented with soy-derived isoflavones (05 and 20 mg/kg BW/day), and control (S–).

Table 2

Food intake, body and reproductive organs weight of rabbits fed soy meal containing diet (S+), or supplemented with soy isoflavones (5 and 20 mg/kg BW/day)

Variable	S– (Control)	ISF 05	ISF 20	S+
Body weight BW (g)	3754.4 ± 56.73 a	3578.0 ± 54.00 a	3340 ± 39.21 b	3912.5 ± 52.80*
Food intake ^a (g)	112.1 ± 2.50 a	109.0 ± 1.70 a	99.0 ± 1.8 b	119.2 ± 2.00*
Testes/BW (mg/g)	1.53 ± 0.02 a	1.55 ± 0.01 a	1.57 ± 0.04 a	1.50 ± 0.01 ns
Epididymides/BW (mg/g)	0.61 ± 0.01 a	0.63 ± 0.00 a	0.63 ± 0.01 a	0.57 ± 0.01 ns
Prostate/BW (mg/g)	0.205 ± 0.00 a	0.197 ± 0.00 a	0.193 ± 0.01 a	0.195 ± 0.00 ns
Proprostate/BW (mg/g)	0.198 ± 0.00 a	0.192 ± 0.00 a	0.193 ± 0.00 a	0.205 ± 0.00 ns

Values are given as mean ± S.E.M. of 10 ejaculates, $n = 10$ /group. Rows with different letters differ significantly ($P < 0.05$; Tukey's test). ns, Differences were not significant from S– ($P > 0.05$).

^a Average values from 29 to 33 weeks of age.

* Statistically significant difference from S– ($P < 0.05$).

3.2.3. Reproductive organ weight and morphology

At 230 (± 3) days of age, rabbits were killed as previously described and the reproductive organs were dissected and weighed. Rabbits with diets supplemented with isoflavones at the dose of 20 mg/kg body wt./day had a lesser body weight than those from ISF 05 and S– groups ($P < 0.01$). The lesser body weight of the rabbits in the ISF 20 group was associated with lesser food intake ($P < 0.05$). Repeated analyzes of variance of food consumption and body weight values showed that these variables differed significantly from the control group from 13 and 17 weeks of age, respectively (data not shown). Differences in relative organs weight from the control group were not significant (Table 2).

Histopathologic evaluation of the seminiferous tubules and intersticium of the testis did not identify any pattern of morphologic alterations that could be associated with the soy meal based or isoflavone diets (Fig. 2). The dynamics of the seminiferous epithelial cycle were clearly evident in all testes of this study, corroborating the in vivo findings. No evidence of pathological changes was observed in the epididymal duct of the caput, corpus, and cauda epididymides among the treatments. The efferent ductules as well as the initial segment of the deferent duct were not affected by the treatments. The epithelium of the pro-prostate and prostate acini was carefully examined for metaplastic changes because such alterations are often reported in estrogen-treated animals. However, long-term treatment with soy isoflavones or soy meal based diets failed to induce any pathological changes in the evaluated rabbit sex accessory glands.

3.3. Sexual behavior

Analysis of variance did not reveal differences either in the age that males exhibited the mounting reflex or in the time of reaction in relation to males in the control group. The interval between two consecutive ejaculations into the artificial vagina was less ($P < 0.01$) in ISF 20 group, than ISF 05 and S– groups, but there was no difference between S+ and S– groups (Table 3). The data from the present study indicate that treatment with isoflavones did not adversely influence sexual behavior of the males.

4. Discussion

Despite reports about the potential effects of the PE verified in in vitro studies, in vivo assays have failed to induce major effects on the male reproductive tract. In this context, epididymal

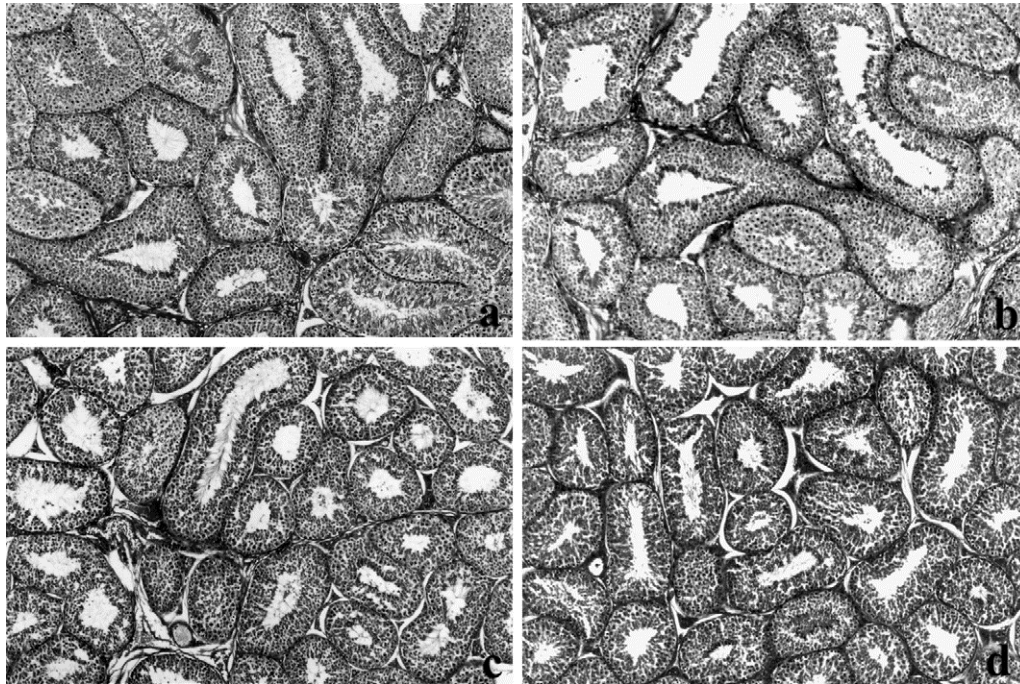


Fig. 2. Testis of rabbits fed soy meal containing diet (a), supplemented with 5 mg/Kg/BW/day with soy isoflavones (b), supplemented with 20 mg/kg/BW/day with soy isoflavones (c), and control (d). HE 100 $\times$.

and testicular sperm counts were not altered in rats administered genistein orally at doses of 12.5–100 mg/kg on postnatal days 1–5 (Nagao et al., 2001), 10–1000 g/day (Shibayama et al., 2001) or 100 g/day of coumestrol (Awoniyi et al., 1997). This was also true in rats chronically administered genistein at a dose of 50 g/day (Roberts et al., 2000), 0.1–10 mg/kg/day through pregnancy and lactation (Fielden et al., 2003), 200 and 2000 mg of genistein per kg of diet for 12 months (Faqi et al., 2004) or 2.5 mg/kg/day for 5 months (Lee et al., 2004). No influence was detected on semen quality in healthy men after supplementation daily for 2 months with soy protein containing 40 mg of isoflavones (Mitchell et al., 2001). Interestingly, in rabbits, genistein caused the increase in sperm motility and concentration and alleviated the negative effects of cypermethrin on semen variables (Yousef et al., 2003). In agreement with these findings, no

Table 3

Effects of soy meal containing diet (S+) or soy isoflavones supplement (05 and 20 mg/kg BW/day) on the age that rabbits expressed mounting reflex, time of reaction, and interval between two consecutive ejaculations into the artificial vagina (t)

Variable	S– (control)	ISF 05	ISF 20	S+
Mounting reflex (days)	123.0 $\pm$ 2.0 a	119.3 $\pm$ 2.8 a	124.5 $\pm$ 3.5 a	118.0 $\pm$ 2.6 ns
Time of reaction (s)	3.7 $\pm$ 0.2 a	4.0 $\pm$ 0.3 a	3.9 $\pm$ 0.2 a	3.6 $\pm$ 0.3 ns
t (s)	97.0 $\pm$ 2.4 a	92.6 $\pm$ 1.8 a	79.0 $\pm$ 1.9 b	106.0 $\pm$ 4.0 ns

Values are given as mean $\pm$ S.E.M., n = 10/group. Rows with different letters differ significantly (P < 0.05; Tukey's test). ns, Differences were not significant from S– (P > 0.05; ANOVA).

negative effects on male fertility were observed in the rabbits of this investigation after soy meal or soy isoflavone treatments. However, isoflavone-containing diets significantly decreased semen volume when treatments were in greater amounts (20 mg/kg body wt./day) than those consumed by the dietary way. This fact resulted in an increase in sperm concentration, but sperm output (sperm concentration $\times$ semen volume) did not differ from the control. Therefore, exocrine testicular function seems to be normal.

Results of the present study demonstrated that testes weight and morphology are not influenced by chronic treatment with a soy meal or isoflavone supplemented diet. In addition, PE treatment did not induce alterations in testes weight of rats (Casanova et al., 1999; Roberts et al., 2000; Shibayama et al., 2001; Fielden et al., 2003; Ohno et al., 2003; Faqi et al., 2004; Lee et al., 2004), rabbits (Yousef et al., 2003) and men (Mitchell et al., 2001).

Smaller body weight in isoflavone-treated rabbits was also reported in rats (Lephart et al., 2001; Nagao et al., 2001), although investigators did not correlate this with food intake. The association with food intake observed in rabbits in the present study was also reported in Sprague–Dawley rats fed diets containing genistein (Casanova et al., 1999), suggesting a possible anorectic effect of PE on the central nervous system, similar to that of endogenous estrogens (Bonavera et al., 1994). This effect, however, seems to be associated with chronic treatment with to large amounts of soy isoflavones because dams did not have significant differences in food intake throughout the gestation and lactation periods (total of 9 weeks); and pups showed decreased food consumption just after 13 weeks of postnatal treatment (data not shown). Because there was no statistically significant difference between dietary controls and soy containing diet groups in body weight gain, there are no apparent detrimental impacts on animal health or well being.

In conclusion, soy meal as main source of protein in the diet of rabbits does not induce deleterious effects on sexual behavior or semen production. Considering this, soy meal can be used for feeding breeding rabbits. Also, normal dietary treatments with soy isoflavones did not cause toxic effects on the evaluated variables of males. However, these results cannot be extrapolated to females, which are admittedly more sensitive to the effect of environmental estrogens.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the colleagues Dr. S. Vasconcelos, Dr. H. Blume and MSc R. G. Mondadori for critical reading of the manuscript and helpful discussion. UPIS, Faculdades Integradas (Brasília, DF) for the material and laboratorial support. Nutrimais rações (Uberlândia, MG) for the development of the specific diets used in this study. CAPES.

References

- Andrade, A.F.C., Yonezawa, L.A., Celeghini, E.C.C., Spers, A., Arruda, R.P., 2002. Um novo modelo de vagina artificial para coelhos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 26, 201–204.
- Awoniyi, C.A., Roberts, D., Chandrashekar, V., Veeramachaneni, D.N., Hurst, B.S., Tucker, K.E., Schlaff, W.D., 1997. Neonatal exposure to coumestrol, a phytoestrogen, does not alter spermatogenic potential in rats. *Endocrine* 7 (3), 337–341.
- Bonavera, J.J., Dube, M.G., Kalra, P.S., Kalra, S.P., 1994. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134 (6), 2367–2372.
- Brown, N.M., Setchell, K.D.R., 2001. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab. Invest.* 81, 735–747.
- Casanova, M., You, L., Gaido, K.W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D.B., Heck, H.A., 1999. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague–Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci.* 51 (2), 236–244.

- Cerundolo, R., Court, M.H., Hao, Q., Michel, K.E., 2004. Identification and concentration of soy phytoestrogens in commercial dog foods. *Am. J. Vet. Res.* 65 (5), 592–596.
- Court, M.H., Freeman, L.M., 2002. Identification and concentration of soy isoflavones in commercial cat foods. *Am. J. Vet. Res.* 63 (2), 181–185.
- Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H.M., 2002. Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128, 145–157.
- Faqi, A.S., Johnson, W.D., Morrissey, R.L., Mc Cormick, D.L., 2004. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reprod. Toxicol.* 18 (4), 605–611.
- Fielden, M.R., Samy, S.M., Chou, K.C., Zacharewski, T.R., 2003. Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. *Food. Chem. Toxicol.* 41 (4), 447–454.
- Kurzer, M.S., Xu, X., 1997. Dietary phytoestrogens. *Rev. Nutr.* 17, 353–381.
- Lee, B.J., Kang, J.K., Jung, E.Y., Yun, Y.W., Baek, I.J., Yon, J.M., Lee, Y.B., Sohn, H.S., Lee, J.Y., Kim, K.S., Nam, S.Y., 2004. Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. *J. Vet. Sci.* 5 (3), 227–234.
- Lephart, E.D., Adlercreutz, H., Lund, T.D., 2001. Dietary soy phytoestrogen effects on brain structure and aromatase in Long-Evans rats. *Neuroreport* 12 (16), 3451–3455.
- Lephart, E.D., West, T.W., Weber, K.S., Rhees, R.W., Setchell, K.D., Adlercreutz, H., Lund, T.D., 2002. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol. Teratol.* 24 (1), 5–16.
- Mitchell, J.H., Cawood, E., Kinniburgh, D., Provan, A., Collins, A.R., Irvine, D.S., 2001. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clin. Sci.* 100, 613–618.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H., 2001. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol.* 15 (4), 399–411.
- Ohno, S., Nakajima, Y., Inoue, K., Nakazawa, H., Nakajin, S., 2003. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. *Life Sci.* 74 (6), 733–742.
- Reinli, K., Block, G., 1996. Phytoestrogen content of foods—a compendium of literature values. *Nutr. Cancer* 26 (2), 123–148.
- Roberts, D., Veeramachaneni, D.N., Schlaff, W.D., Awoniyi, C.A., 2000. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine* 13 (3), 281–286.
- Setchell, K.D.R., Gosselin, S.J., Welsh, M.B., Johnston, J.O., Balistreri, W.F., Kramer, L.W., Dresser, B.L., Tarr, M.J., 1987. Dietary estrogens—a probable cause of infertility and liver disease in captive Cheetahs. *Gastroenterology* 93, 225–233.
- Shibayama, T., Fukata, H., Sakurai, K., Adachi, T., Komiyama, M., Iguchi, T., Mori, C., 2001. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocrinol. J.* 48 (6), 655–663.
- Strauss, L., Makela, S., Joshi, S., Huhtaniemi, I., Santti, R., 1998. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Mol. Cell. Endocrinol.* 144, 83–93.
- Thigpen, J.E., Setchell, K.D., Ahlmark, K.B., Locklear, J., Spahr, T., 1999. Phytoestrogen content of purified open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab. Anim. Sci.* 49 (5), 530–536.
- Yousef, M.I., El-Demerdash, F.M., Al-Salhen, K.S., 2003. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on semen quality and testosterone levels of rabbits. *J. Environ. Sci. Health B* 38 (4), 463–478.

EFFECTS OF CHRONIC TREATMENT WITH SOY DERIVED ISOFLAVONES ON
REPRODUCTIVE HEALTH OF MALE RABBITS

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ISOFLAVONAS DA SOJA NA
SAÚDE REPRODUTIVA DE COELHOS MACHOS

*Júlio Roquete CARDOSO^{1,2}, Rafael Gianella MONDADORI², Eliandra BIANCHINI²,
Sônia Nair BÁO³*

¹ Veterinary, doctorating in Cellular and Structural Biology of the Institute of Biological Sciences – University of Campinas, Campinas, SP.

² Professor, Department of Veterinary Medicine, UPIS – Faculdades Integradas, Brasília.

³ Professor, Dr. Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil.

Correspondência para:

Júlio Roquete Cardoso

Quadra 17, conjunto D, casa 70

Sobradinho, DF

CEP: 73.045-174.

Tel (61)-3591-5556 (resid), (61)-3488-9931; fax: (61)-3488-9907 E-mail

julio01963@upis.br ou roquette@bol.com.br

EFFECTS OF CHRONIC TREATMENT WITH SOY DERIVED ISOFLAVONES ON REPRODUCTIVE HEALTH OF MALE RABBITS

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ISOFLAVONAS DA SOJA NA SAÚDE REPRODUTIVA DE COELHOS MACHOS

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the effects of chronic exposure to soy isoflavones concentrate on the morphology of reproductive organs, semen quality, puberty age, serum levels of testosterone and sexual behavior of male rabbits. With this purpose, female rabbits were randomly assigned to receive orally 2.5mg (ISF 2.5) or 10mg (ISF 10) of soy isoflavones/kg of body wt/day. The animals of control group were manipulated as the other groups and received placebo (corn starch). All the rabbits were maintained on a soy-and alfafa-free diet throughout the gestation and lactation. Their male offspring received the same treatments from weaning to 33 weeks of age. Chronic exposure to isoflavones did not induce statistically significant alteration in the age at puberty, semen volume, daily sperm output, sperm concentration, motility, vigor and abnormalities. Also, isoflavones exposure had no effects on serum testosterone levels or sexual behavior in any group. Histopathologic evaluation did not reveal alterations in the testis, epididymis, prostate and pro-prostate glands of the rabbits. Taken together, these results show that gestational, lactational and post-lactational exposure to soy isoflavones, in doses comparable to those found in soy-containing animal and human diets, has no adverse effects on the reproductive parameters of male rabbits.

UNITERMS: Phytoestrogens; Isoflavones; Reproduction; Rabbits

INTRODUCTION

Isoflavones (ISF) are a class of phytoestrogens (PE) found principally in soybeans and soy-protein foods. The estrogenic activity of these compounds was first described in 1946, in a syndrome known as clover disease in sheep (KURZER and XU, 1997). After grazing on pastures of subterranean red clover, Australian ewes suffered from a severe reproductive disorder that resulted in permanent infertility. Since then, several investigations have been performed to elucidate the biological action of PE in human and animal tissues.

It has long been known that PE exert estrogenic effects on the central nervous system, induce estrus, and stimulate growth of the genital tract of female animals (THIGPEN et al., 1999), but little is known about the effects of developmental and life-time exposure to PE in males, which have lower number of estrogen receptors (KURZER and XU, 1997). Male genital abnormalities have been noticed in men and in a variety of animal species following prenatal, neonatal or post pubertal exposure to estrogens, as evidenced in populational and experimental studies (STILLMAN, 1982; ARAI et al., 1983). Considering that the potency of the PE such as genistein or daidzein, can even exceed that of estradiol, especially in infants who are fed soy-based formula as a sole source of nutrition (GREIM, 2004), the safety of these agents must be better investigated.

Recent studies show that chronic or transient PE exposure appears to be innocuous for testicular or epididimal sperm counts of rats (AWONIYI et al., 1997; ROBERTS et al., 2000; NAGAO et al., 2001; SHIBAYAMA et al., 2001; FIELDEN et al., 2003; FAQI et al., 2004; JUNG et al., 2004; LEE, KANG and JUNG, 2004). Although, *in vitro* studies have shown that genistein induces apoptosis of testicular cell lines, and inhibits their growth and proliferation (KUMI-DIAKA, RODRIGUEZ and GOUDAZE, 1998). Also it may interfere with percentage of sperm motility and modulate sperm capacitation, acrosome reactions and fertilizing ability (KUMI-DIAKA and TOWNSEND, 2001; ADEOYA et al., 2003), with genistein being considerably more potent than 17 β -estradiol (ADEOYA et al., 2003). Furthermore, these agents may alter the volume of the sexually dimorphic nucleus of brain (LEPHART, ADLERCREUTZ and LUND, 2001; LEPHART, WEST and WEBER, 2002) and promote deleterious alterations in the sexual behavior of rats (WHITTEN, PATISAUL and YOUNG, 2002; WISNIEWSKI et al., 2003), in which adult males were less likely to mount, intromit and ejaculate during mating tests.

To improve the knowledge about the influence of PE on male reproductive health, the present study investigated the effects of the chronic exposure to soy isoflavones on: (1) morphology of the reproductive organs; (2) semen quality; (3) age at puberty; (4) serum testosterone levels; and (5) sexual behavior of male rabbits.

MATERIALS AND METHODS

Animals

With due compliance of the international guiding principles for animal research, the experimental protocol was reviewed and approved by the University of Brasília Institute of Biological Sciences Ethical Committee to Animal Use. One male New Zealand and 10 female rabbits between 8 and 10 months of age were started in this study. They were housed individually in steel cages equipped with automatic watering systems. Animals were kept on natural photoperiod and environmental temperature.

Treatments

Females were randomly assigned to a control (n=4) and two treatment groups (n=3/group). The animals from the treatment groups received 2.5mg (ISF 2.5) or 10mg (ISF 10) of soy isoflavones/kg of body wt/day (Soy Isoflavones, 40% - DEG Importação de Produtos Químicos Ltda – São Paulo - SP). The animals of the control group received corn starch as placebo. The proper dose of isoflavones as well as placebo was inserted directly into the oral cavity after rabbit immobilization. All animals were kept on a soy- and alfalfa-free diet, in which soy and alfalfa proteins were replaced with cottonseed meal and meat meal protein. The three groups received water and food *ad libitum*. Soy isoflavones concentrate used in the present study is similar to commercially available soy-derived products, currently used for hormonal replacement, and for the prevention or treatment of various hormone-dependent diseases. The most common dose used in these cases is 1 mg/kg body wt/day.

To minimize the genetic influence, females were mated by the same buck. At the fifth week of age, male offspring were numbered and surplus pups were randomly excluded

from the study. Remaining six pups of each isoflavones-treatment groups and ten pups of the untreated control group received the same treatments that were given to their respective mothers from weaning (5 weeks) to 33 weeks of age. As a consequence, these animals were exposed to isoflavones indirectly via maternal consumption during gestation and lactation and directly by oral route from weaning to adulthood. During the exposure period, the animals were monitored daily for health status. Body weights and food consumption were measured weekly throughout the experimental period.

Ejaculates collection and evaluation

The artificial vagina (AV) for semen collection was built based on a model described by Andrade et al. (2002). Its mucosae was filled with warm water (60° C), and it was used when the inner temperature was between 45° and 50° C. A collector tube was attached onto one of the edges, and the free edge was positioned to penis intromission. Before semen collection, bucks were allowed one false mount and, at the subsequent mounting, the AV was adequately positioned on the dorsum of the stimulus female allowing penis intromission.

From 14 to 25 weeks of age, semen samples were collected once a week to evaluate the sexual maturation. After this period, the animals were collected every other day for 5 weeks, permitting a total of 17 collections. The first seven samples were used to stabilize sperm output and were not included in the analysis, so the daily sperm output was quantified using the last 10 ejaculates (THOMPSON and BERNDTSON, 1993). This procedure minimizes the possibility of false detection of treatment-induced changes.

After removing and weighing the gel mass, ejaculate volume was recorded in the graduated tube attached to the artificial vagina. Just after the ejaculation, a semen drop was mixed with the same volume of heated saline on a warm (37 °C) slide. The sperm motility (0-100%) and vigor (0-5) were subjectively evaluated in light microscope (400X). For determination of sperm concentration, ejaculates were diluted 1:100 in a 4% formol/0,9% saline solution and counted twice in Neubauer haemocytometer (GmbH+Co., Brandstwierte 4, 2000 Hamburg 11, Germany) using a light microscope (Nikon Eclipse C600, Japan) (400X). The sperm morphology was examined on semen smears stained with Congo red and Gentian violet solutions.

Age at Puberty and Sexual Behavior

The age at puberty was considered when sperm counts stopped to raise. The ages (in weeks), which males showed stabilized ejaculate values were used for data analysis.

To quantitatively measure the males' sexual behavior, the time of reaction (latency to begin mounting); the interval between two consecutive ejaculations in the artificial vagina; and the mounting reflex were determined.

The time of reaction (time elapsed from the moment of subjecting a doe to the buck and mounting) and the interval between two consecutive ejaculations into the artificial vagina were measured in seconds using a stopwatch. The mounting reflex (indicative of sexual interest) was considered when rabbits were capable to mount and complete the copulation and was quantified in days of age. Values significantly higher or lower than those from the control group indicate decreased or increased libido, respectively.

Tissue collection and evaluation

At 33 weeks of age, males were killed via jugular exsanguination, after barbiturate anesthesia. Blood samples were centrifuged at 1600 g for 8 minutes, and serum was stored at –20 °C until analysis. Serum testosterone was assayed by automated Kimiluminescence (ACS 180 plus Bayer equipment) using manufacturer protocol.

Testes, epididymides, proprostate and prostate glands were dissected and weighed. For histopathological evaluation, portions of the organs were fixed in Bouin's solution, washed with running water, and transferred into 70% ethanol before being processed for 24 h in an automated processor (Leica TP 1020 – Histology & E. M. Products – SP, Brazil). Subsequently they were embedded in paraffin wax, sectioned at 5 µM thickness, and stained with hematoxylin and eosin. The sections were carefully examined for the presence of abnormalities.

Statistical Methods

As all data were found to be normally distributed, different parameters were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA). When a significant treatment effect was found, differences among groups' means were assessed by Tukey's test. Values were expressed as mean ± SD (Standard Deviation). Statistical analyses were carried out using SAS System for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

RESULTS

Ejaculate parameters

The mean values of the ejaculate volume, total motile sperm per ejaculate, vigor of motile sperm, percentage of sperm abnormalities, sperm concentration and daily sperm output are summarized in table 1. The differences in these parameters between the groups were not statistically significant ($P>0.05$).

Table 1. Effects of soy isoflavones treatment (2.5 and 10mg/Kg BW/day) on semen characteristics of rabbits

	Groups		
	Control	ISF 2.5	ISF 10
Volume (ml)	0.54 ± 0.0	0.52 ± 0.0	0.51 ± 0.0
Motility (%)	77.5 ± 4.0	80.1 ± 3.6	79.1 ± 5.2
Vigor (0-5)	3.1 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.1
Abnormal sperm (%)	25.3 ± 1.2	21.5 ± 4.6	23.0 ± 4.1
Sperm concentration (x10 ⁶ /ml)	197.1 ± 35.5	204.6 ± 17.5	223.8 ± 17.0
Daily sperm output (x10 ⁶)	104.7 ± 16.3	108.4 ± 6.8	114.6 ± 7.0

Data are shown as group means ± SD of 10 ejaculates per animal. No intergroup differences were significant at the 5% level of confidence.

Rabbits treated with 10mg of soy isoflavones/kg body wt/day presented ejaculates with motile sperm earlier than the those treated with 2.5 mg/kg body wt/day and the untreated control group ($P<0.05$), however this difference disappeared in the adult males.

Reproductive organs weight and morphology

Absolute (data not shown) and relative weights of the testes, epididymis, prostate and pro-prostate were similar in all studied groups (Table 2). Gross morphology is unlikely to be affected by long-term administration of isoflavones. Testes shown apparently normal pattern of spermatogenesis in the seminiferous tubules. Sex accessory glands presented a typical simple columnar epithelium with no evidence of pathological changes. This secretory tissue gives rise extensive branching folds projecting into the acinar lumen, which are peculiar of the species. Also, no evidence of pathological changes was observed in the epididymal duct of the caput, corpus, and cauda epididymides among the treatment groups. Results from the histological approach of the reproductive organs support the in vivo observations.

Table 2. Food intake, body and reproductive organs weight of rabbits treated with soy isoflavones (2.5 and 10mg/kg BW/day)

	Groups		
	Control	ISF 2.5	ISF 10
Body weight BW (g)	3754.4 ± 179.50	3684.1 ± 112.80	3595.4 ± 121.85
Food intake ¹ (g)	112.1 ± 8.00	114.0 ± 5.25	110.5 ± 13.80
Testes/BW (mg/g)	1.53 ± 0.06	1.54 ± 0.03	1.53 ± 0.02
Epididymides/BW (mg/g)	0.61 ± 0.04	0.64 ± 0.01	0.63 ± 0.00
Prostate/BW (mg/g)	0.205 ± 0.09	0.198 ± 0.00	0.196 ± 0.00
Proprostate/BW (mg/g)	0.198 ± 0.01	0.196 ± 0.00	0.193 ± 0.00

Values are given as mean ± SD of 10 ejaculates per animal. No intergroup differences were significant at the 5% level of confidence.

¹ Average values obtained during post-natal weeks 29 to 33.

Age at puberty, sexual behavior and serum testosterone concentration

The age at puberty (mean and standard deviations) in the different groups was: control, 161 ± 11.4 days; ISF 2.5, 170 ± 9 days; and ISF 10, 163 ± 11.8 days. These data did not reach statistically significant differences.

Chronic treatment of rabbits with soy isoflavones did not cause significant statistical differences in the measurable parameters employed to the sexual behavior assessment (Table 3). A subjective evaluation based on simple observation of the mating routine for semen collections (over 25 mates per animal), corroborates the objective analyses. In addition, serum concentrations of testosterone did not differ among the groups.

Table 3. Effects of soy isoflavones treatment (2.5 and 10mg/kg BW/day) on the time of reaction, interval between two consecutive ejaculations into the artificial vagina (Δt), and serum testosterone levels

	Groups		
	Control	ISF 2.5	ISF 10
Time of reaction (sec.)	3.7 ± 0.7	3.9 ± 0.2	3.6 ± 0.2
Δt (sec.)	97.0 ± 7.5	95 ± 10.9	105.8 ± 13.4
Testosterone levels (ng/dl)	800 ± 141	750 ± 115	726.3 ± 112.6

No intergroup differences were significant at the 5% level of confidence.

DISCUSSION

In vivo data show that PE have a wide range of biologic effects at doses and plasma concentrations considered normal in human diets. The doses reported to be biologically active in humans (0.4 to 10 mg/Kg body wt/day) are lower than doses generally reported to be active in rodents (10 to 100 mg/Kg body wt/day), although some studies have reported rodent responses at lower doses (WHITTEN and PATISAUL, 2001). Some estimative of isoflavones intake from soy-based diets consumption ranges from 6 to 11 mg/kg/body wt/day in human infants (SETCHELL et al., 1998), 1 to 1.5 mg/kg body wt/day in human adults (STRAUSS et al., 1998), 0.6 to 4.5 mg/kg/body wt/day in cats (COURT and FREEMAN, 2002) and 1.6 to 3.5 mg/kg body wt/day in monkeys (SHARPE et al., 2002).

The doses of soy isoflavones we find to be safe for male reproductive health are similar to the amounts consumed by human and animal eating soy-based diets.

McClain et al. (2005) reported atrophy of testes and absence of spermatozoa in the epididymus of Beagle dogs treated with genistein, but at a very high dose of this purified isoflavone. A comparable dose of genistein (≈ 500 mg/kg/day) was also required to induce persistent structural changes in rats (STRAUSS et al., 1998), similar to those observed in mice treated with potent synthetic estrogens. However doses of PE within dietary exposure levels had failed to induce major effects in sperm counts of rats (ROBERTS et al., 2000; SHIBAYAMA et al., 2001; FIELDEN et al., 2003; FAQI et al., 2004; JUNG et al., 2004; LEE, KANG and JUNG, 2004), and men (MITCHELL et al., 2001). In this context, it is opportune to consider that almost all commercially available rodent diets contain substantial levels of PE (THIGPEN et al., 1999; BROWN and SETCHELL, 2001; LEPHART, WEST and WEBER, 2002), and no reports of impaired reproductive performance has been registered in these animals, as well as in rabbits fed a soy meal-based diet (CARDOSO and BÁO, 2007).

The effect of the PE on the rabbits' reproductive system seems to depend on the compound, exposure dose and period of administration. Total isoflavones exposure at doses ranging from 2 to 5mg/Kg of BW every other day for a subchronic period had several beneficial effects on semen characteristics and sexual behavior of male rabbits (YOUSEF, EL-DEMERDASH and AL-SALHEN, 2003; YOUSEF, ESMAIL and BAGHDADI, 2004), but rabbits treated with daidzein at 0.1 mg/Kg/day showed erectile dysfunction (SRILATHA and ADAIKAN, 2004). In contrast, results of the present study did not show

either, beneficial nor deleterious effects on reproductive function and behavior of male rabbits. Also, a soy meal-based diet (17% of diet) did not change semen quality, reproductive organs morphology and sexual behavior of rabbits, as we have shown earlier (CARDOSO and BÁO, 2007).

Semipurified isoflavone concentrate exposure did not induce alterations in reproductive organs weight and morphology in this investigation, which is in accordance with studies in rats (CASANOVA et al., 1999; ROBERTS et al., 2000; SHIBAYAMA et al., 2001; FIELDEN et al., 2003; OHNO et al., 2003; FAQI et al., 2004; LEE, KANG and JUNG, 2004). However, there appears to be rats strain differences in the effects of PE on prostate structure. Decrease in prostate weight and scamous metaplasia of collector ducts was observed in Outbred Han NMRI rats treated with 2.5 mg/Kg of genistein for 7 days (STRAUSS et al., 1998); the same dose for a greater period (5 weeks) did not cause lesions in ICR rats prostate (LEE, KANG and JUNG, 2004). In addition, doses of genistein 4 to 16 times higher had no effects on Wistar rats prostate weight (OHNO et al., 2003). Such differences like those discussed earlier in rabbits are not well explained due to the paucity of comparative data about the absorption, metabolism and bioavailability of PE. Moreover, these divergences motivate intense discussions about the possible undesirable side effects of these compounds on the human health.

In conclusion, our findings show that isoflavone exposure at normal human and animal dietary levels, which are recognized to have beneficial role in the prevention of several types of chronic diseases, do not impact male function and behavior of male rabbits.

This study provides additional data about the consequence of PE exposure on the reproductive male health, however the results may not be integrally extrapolated to females

and other species, since several differences has been reported among species, and in the compound, dose and route of administration of these substances.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the UPIS - Faculdades Integradas (Brasília, DF) for the material and laboratorial support, and CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição crônica a concentrado de isoflavonas da soja sobre a morfologia dos órgãos reprodutivos, qualidade do sêmem, idade a puberdade, níveis séricos de testosterona e comportamento sexual de coelhos machos. Com este propósito, fêmeas foram aleatoriamente designadas para receber, por via oral, 2,5mg (ISF 2,5), ou 10mg (ISF 10) de isoflavonas da soja por quilo de peso corporal por dia. Os animais do grupo controle foram tratados como os dos demais grupos e receberam placebo (amido de milho). Todos os coelhos foram alimentados com dieta livre de soja e alfafa ao longo da gestação e lactação. A prole macho recebeu os mesmos tratamentos, da desmama até 33 semanas de vida. A exposição crônica a isoflavona não causou alterações estatisticamente significativas na idade a puberdade, volume de sêmem, emissão diária de espermatozóides, concentração espermática, motilidade, vigor e morfologia espermática. Em adição, a exposição à isoflavonas não resultou em efeitos negativos sobre os níveis de testosterona, ou no comportamento sexual dos coelhos. A avaliação histopatológica também não revelou qualquer alteração nos testículos, epidídimos, e nas glândulas próstata e pré-próstata dos animais. Os resultados deste estudo

apontam que a exposição gestacional, lactacional e pós-lactacional a isoflavonas da soja, em doses comparáveis àquelas em que homens e animais estão expostos ao consumirem dieta a base de soja, não causa efeitos adversos nos parâmetros reprodutivos de coelhos machos.

UNITERMOS: Fitoestrógenos, Isoflavonas, Reprodução, Coelhos

REFERENCES

ADEOYA-OSIGUWA, S. A.; MARKOULAKI, S.; POCOCK, V.; MILLIGAN, S. R.; FRASER, L. R. 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 18, p. 100-7, Jan. 2003.

ANDRADE, A. F. C.; YONEZAWA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C.; SPERS, A.; ARRUDA, R. P. Um novo modelo de vagina artificial para coelhos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 26, p.201-04, jul. 2002.

ARAI, Y.; MORI, T.; SUZUKI, Y.; BERN, H. A. Long-term effects of perinatal exposure to sex steroids and diethylstilbestrol on the reproductive system of male mammals. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v. 84, p. 235-68, Oct. 1983.

AWONIYI, C. A.; ROBERTS, D.; CHANDRASHEKAR, V.; VEERAMACHANENI, D. N.; HURST, B. S.; TUCKER, K. E.; SCHLAFF, W. D. Neonatal exposure to coumestrol, a phytoestrogen, does not alter spermatogenic potential in rats. **Endocrine**, Tokyo, v. 7, p. 337-41, Dec. 1997.

BROWN, N. M.; SETCHELL, K. D. R. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. **Lab. Invest.**, New York, v. 81, p. 735–47, May 2001.

CARDOSO, J. R.; BÁO, S. N. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v. 97, p. 237-45, Feb. 2007.

CASANOVA, M.; YOU, L.; GAIDO, K. W.; ARCHIBEQUE-ENGLE, S.; JANSZEN, D. B.; HECK, H. A. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci.*, Orlando, v. 51, p.236-44, May 1999.

COURT, M. H.; FREEMAN, L. M. Identification and concentration of soy isoflavones in commercial cat foods. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, v. 63, p.181-5, Feb. 2002.

FAQI, A. S.; JOHNSON, W. D.; MORRISSEY, R. L.; MC CORMICK, D. L. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reprod. Toxicol.*, New York, v.18, p. 605-11, Mar. 2004.

FIELDEN, M. R.; SAMY, S. M.; CHOU, K. C.; ZACHAREWSKI, T. R. Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. *Food. Chem. Toxicol.*, New York, v. 41, p. 447-54, Apr. 2003.

GREIM, H. A. The Endocrine and Reproductive System: Adverse Effects of Hormonally Active Substances? **Pediatrics**, Springfield, v. 113, p. 1070-75, Apr. 2004.

JUNG, M. Y.; LEE, Y. B.; SOHN, H. S.; LEE, J. Y.; KIM, K. S.; YU, W. J.; DO, J. C.; KIM, Y. C.; NAM, S. Y. Effects of exposure to genistein and estradiol on reproductive development in immature male mice weaned from dams adapted to a soy-based commercial diet. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 66, p. 347-54, Nov. 2004.

KUMI-DIAKA, J.; RODRIGUEZ, R.; GOUDAZE, G. Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on growth and proliferation of testicular cell lines. **Biol. Cell**, Colchester, v. 90, p. 349-54, Jul. 1998.

KUMI-DIAKA, J.; TOWNSEND, J. Effects of genistein isoflavone (4',5',7'-trihydroxyisoflavone) and dexamethasone on functional characteristics of spermatozoa. **J. Med. Food.**, New York, v. 4, p. 39-47, Mar. 2001.

KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo alto, v. 17, p. 353-81, 1997.

LEE, B. J.; KANG, J. K.; JUNG, E. Y. Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. **J. Vet. Sci.**, Suwon, v. 5, p. 227-34, Sep. 2004.

LEPHART, E. D.; ADLERCREUTZ, H.; LUND, T. D. Dietary soy phytoestrogen effects on brain structure and aromatase in Long-Evans rats. **Neuroreport**, Oxford, v.12, p. 3451-5, Nov. 2001.

LEPHART, E. D.; WEST, T. W.; WEBER, K. S. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. **Neurotoxicol. Teratol.**, New York, v. 24, p. 5-16, Jan. 2002.

MCCLAIN, R.; WOLZ, E.; DAVIDOVICH, A.; PFANNKUCH, R.; BAUSCH, J. Suchronic and chronic studies with genistein in dogs. **Food. Chem. Toxicol.**, New York, v. 43, p. 56-80, Oct. 2005.

MITCHELL, J. H.; CAWOOD, E.; KINNIBURGH, D.; PROVAN, A.; COLLINS, A. R.; IRVINE, D. S. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. **Clin. Sci.**, London, v. 100, p. 613-18, Jun. 2001.

NAGAO, T.; YOSHIMURA, S.; SAITO, Y.; NAKAGOMI, M.; USUMI, K.; ONO, H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. **Reprod. Toxicol.**, New York, v. 15, p. 399-411, Jul. 2001.

OHNO, S.; NAKAJIMA, Y.; INOUE, K.; NAKAZAWA, H.; NAKAJIN, S. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. **Life Sci.**, Oxford, v. 74, p. 733-42, Jun. 2003.

ROBERTS, D.; VEERAMACHANENI, D. N.; SCHLAFF, W. D.; AWONIYI, C. A. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. **Endocrine**, Tokyo, v. 13, p. 281-86, Dec. 2000.

SETCHELL, K. D.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; CAI, J.; HEUBI, J. E. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, Suppl 6, p.1453-61, Dec. 1998.

SHARPE, R. M.; MARTIN, B.; MORRIS, K.; GREIG, I.; MCKINNELL, C.; MCNEILLY, A. S.; WALKER, M. Infant feeding with soy formula milk: effects on the testis and on blood testosterone levels in marmoset monkeys during the period of neonatal testicular activity. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 17, p.1692-703, Jul. 2002.

SHIBAYAMA, T.; FUKATA, H.; SAKURAI, K.; ADACHI, T.; KOMIYAMA, M.; IGUCHI, T.; MORI, C. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 48, p. 655-63, Dec. 2001.

SRILATHA, B.; ADAIKAN, T. G. Estrogen and fitoestrogen predispose to erectile dysfunction: ER-alpha and ER-beta in the cavernosum play a role? **Urology**, Ridgewood, v. 63, p.382-6, Feb. 2004.

STILLMAN, R. J. In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 142, p.905-21, Apr. 1982.

STRAUSS, L.; MAKELA, S.; JOSHI, S.; HUHTANIEMI, I.; SANTTI, R. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. **Mol. Cell. Endocrinol.**, Amsterdam, v. 144, p. 83-93, Sep. 1998.

THIGPEN, J. E.; SETCHELL, K. D.; AHLMARK, K. B.; LOCKLEAR, J.; SPAHR, T. Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. **Lab. Anim. Sci.** Joliet, v. 49, p. 530-36, Oct. 1999.

THOMPSON, T.; BERNDTSON, W. E. Testicular weight, sertoli cell number, daily sperm production, and sperm output of sexually mature rabbits after neonatal or prepubertal hemicastration. **Biol. Reprod.**, New York, v. 48, p. 952-57, May 1993.

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogens action. **Environ. Health Perspect.**, New York, v. 109, p. 5-20, Mar. 2001.

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B.; YOUNG, L. J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. **Neurotoxicol. Teratol.**, New York, v. 24, p. 47-54, Jan. 2002.

WISNIEWSKI, A. B.; KLEIN, S. L.; LAKSHMANAN, Y.; GEARHART, J. P. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. **J. Urol.**, Baltimore, v. 169, p. 1582-86, Apr. 2003.

YOUSEF, M. I.; EL-DEMERDASH, F. M.; AL-SALHEN, K. S. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin .on semen quality and testosterone levels of rabbits. **J. Environ. Sci. Health. B.**, New York, v. 38, p. 463-78, Jul. 2003.

YOUSEF, M. I.; ESMAIL, A. M.; BAGHDADI, H. H. Effect of isoflavones on reproductive performance, testosterone levels, lipid peroxidation, and seminal plasma

biochemistry of male rabbits. **J. Environ. Sci. Health. B.**, New York, v. 39, p. 819-33, Jul.
2004.

3. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

- A exposição perinatal ou crônica a isoflavonas da soja em níveis compatíveis com os adquiridos pelo consumo de soja por homens e animais é aparentemente incapaz de provocar efeitos deletérios ao desenvolvimento e função do aparelho reprodutor de coelhos machos. Considerando isto, podemos afirmar que o farelo de soja como fonte protéica na alimentação de coelhos machos é uma alternativa segura do ponto de vista reprodutivo.
- A exposição crônica a níveis maiores de isoflavonas por via oral (20mg/kg/dia), na forma de concentrados de isoflavonas, causa redução do consumo de alimentos e diminuição em 11% no ganho de peso corporal de coelhos machos. Este fato, também descrito em ratos, pode ser devido ao efeito anorético promovido por estrogênios.
- O farelo de soja (46% de proteína), como principal fonte protéica na ração, não encerra uma quantidade de isoflavonas suficiente para comprometer a ingestão alimentar e o ganho de peso dos animais, logo dieta contendo soja pode ser utilizada seguramente em plantéis destinados ao abate.

- Os resultados deste estudo não sustentam a hipótese de que a exposição perinatal a isoflavonas possa comprometer o desenvolvimento fetal de coelhos e causar alterações que integrem a síndrome da malformação testicular, como aquelas relatadas como consequência da exposição a estrogênios manufaturados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, N. R. Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. Aust. Vet. J., v. 67, n. 6, p. 197-201, 1990.

Adeoya-Osiguwa S. A., Markoulaki, S., Pocock, V., Milligan, S.R., Fraser, L. R. 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. Hum. Reprod., v. 18, n. 1, p. 100-7, 2003.

Adlercreutz, H., Martin, Mousavi, Y., Clark, J., Hockerstedt, K., Hamalainen, E., Wahala, K., Makela, T., Hase, T. Dietary phytoestrogens and cancer: *In vitro* and *in vivo* studies. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., v. 41, n. 3-8, p. 331-37, 1992.

Agarwal, R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. Biochem. Pharmacol., v. 60, n. 8, p. 1051-9, 2000.

Bocquet, A., Bresson, J. L., Briend, A., Chouraqui, J. P., Darmaun, D., Dupont, C., Frelut, M.L., Ghisolfi, J., Goulet, O., Pute,t G., Rieu, D., Turck, D., Vidailhet, M. Infant formulas and soy protein-based formulas: current data. Arch. Pediatr., v. 8, n. 11, p.1226-33, 2001.

Brown, N., M., Setchell, K., D., R. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab. Invest.*, v. 81, n. 5, p. 735–47, 2001.

Burke, T. W., Tortolero-Luna, G., Malpica, A., Baker, V. V., Whittaker, L., Johnson, E. Endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, v.23, n. 2, p. 411-56, 1996.

Casanova, M., You, L., Gaido, K. W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D. B., Heck, H. A. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci.*, v. 51, n. 2, p. 236-44, 1999.

Cerundolo, R., Court, M. H., Hao, Q., Michel, K. E. Identification and concentration of soy phytoestrogens in commercial dog foods. *Am. J. Vet. Res.*, v. 65, n. 5, p. 592-6, 2004.

Clapauch, R., Meirelles, R. M. R., Julião, M. A. S. G., Loureiro, C. K. C., Giarodoli, P. B., Pinheiro, S. A., Harrigan, A. R., Spritzer, P. M., Pardini, D. P., Weiss, R. V., Athayde, A., Russo, L. A., Pova, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do departamento de endocrinologia feminina da sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia (SBEM). *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, n.6, p. 679-95, 2002.

Cooper, C., Campion, G., Melton, L. J. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteopros. Int.*, v. 2, p. 285-9, 1992.

Court, M. H., Freeman, L. M. Identification and concentration of soy isoflavones in commercial cat foods. *Am. J. Vet. Res.*, v. 63, n. 2, p. 181-5, 2002.

Couse, J. E., Mahato, D., Eddy, E. M., Korach, K. S. Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 13, n. 4, p. 211-9, 2001.

Degen, G. H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H. M. Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.*, v. 128, n. 1-3, p. 145-57, 2002.

Evans, B. A., Griffiths, K., Mortons, M. S. Inhibition of 5 alpha reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J. Endocrinol.*, v. 147, n. 2, p. 295-302, 1995.

Faqi, A. S., Johnson, W. D., Morrissey, R. L., Mc Cormick, D. L. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reprod. Toxicol.*, v. 18, n. 4, p. 605-11, 2004.

Franke, A. A., Custer, L. J., Tanaka, Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 68, n. 6, p. 1466-73, 1998.

Fritz, W. A., Coward, L., Wang, J., Lamartiniere, C. A. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 12, p. 2151-58, 1998.

Glazier, M. G., Bowman, M. A. A review of evidence for use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch. Intern. Med.*, v. 161, n. 9, p. 1161-72, 2001.

Helmut, A., Greim, M. D. The endocrine and reproductive system: Adverse effects of hormonally active substances? *Pediatrics*, v. 113, n. 4, p. 1070-75, 2004.

Hess, R. A., Zhou, Q., Nie, R., Oliveira, C., Hyun, C., Nakai, M., Carnes, K. Estrogens and epididymal function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 13, n. 4, p. 273-83, 2001.

Irvine, C. H., Fitzpatrick, M. G., Alexander, S. L. Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 217, n. 3, p. 247-53, 1998.

Jarred, R. A., McPherson, S. J., Jones, M. E., Simpson, E. R., Risbridger, G. P. Anti-androgenic action by red clover-derived dietary isoflavones reduces non-malignant prostate enlargement in aromatase knockout (ArKo) mice. *Prostate*, v. 56, n. 1, p. 54-64, 2003.

Kallela, K., Heinonen, K., Saloniemi, H. Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. A case report. *Nord. Vet. Med.*, v. 36, n. 3-4, p.124-9, 1984.

Kao, Y. C., Zhou, C., Sherman, M., Laughton, C. A., Chen, S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ. Health Perspect.*, v. 106, n. 2, p. 85-92, 1998.

Kelly, G. E., Nelson, C., Waring, M. A., Joanou, G.E., Rideer, A., Y. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in humane urine. *Clin. Chim. Acta*, v. 223, n. 1-2, p. 9-22, 1993.

King, R. A., Bursill, D. B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 67, n. 5, p. 867-72, 1998.

Kumi-Diaka, J., Rodriguez, R., Goudaze, G. Influence of gínestein (4',5,7 trihydroxyisoflavone) on growth and proliferation of testicular cell lines. *Biol. Cell*, v. 90, n. 4, p. 349-54, 1998.

Kurzer, M. S., Xu, X. Dietary phytoestrogens. *Rev. Nutr.*, v. 17, p. 353–381, 1997.

Lephart, E. D., Adlercreutz, H., Lund, T. D. Dietary soy phytoestrogen effects on brain structure and aromatase in Long-Evans rats. *Neuroreport*, v. 12, n. 16, p. 3451-5, 2001.

Lephart, E. D., West, T. W., Weber, K. S., Rhees, R. W., Setchell, K. D., Adlercreutz, H., Lund, T. D. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 24, n. 1, p. 5-16, 2002.

Liggins, J., Bluck, L. J., Rinswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., Bingham, S. A. Daizein and genistein content of fruits and nuts. *Rev. Nutr.*, v. 11, n. 6, p. 326-331, 2000.

Lindner, H. R. Occurrence of anabolic agents in plants and their importance. *Environ. Qual. Saf. Suppl.*, n. 5, p. 151-158, 1976.

Masumori, N., Tsukamoto, T., Kumamoto, Y., Miyake, H., Rhodes, T., Girman, C. J., Guess, H. A., Jacobsen, S. J., Lieber, M. M. Japanese men have smaller prostate volumes but comparable urinary flow rates relative to American men: results of community based studies in 2 countries. *J. Urol.*, v. 155, n. 4, p. 1324-71, 1996.

Miksicek, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.*, v. 44, n. 1, p. 37-43, 1993.

Mitchell, J. H., Cawood, E., Kinniburgh, D., Provan, A., Collins, A. R., Irvine, D. S. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clin. Science*, v. 100, n. 6, p. 613-18, 2001.

Ohno, S., Nakajima, Y., Inoue, K., Nakazawa, H., Nakajin, S. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. *Life Sci.*, v. 74, n. 6, p. 733-42, 2003.

Ohta, T., Nakatsugi, S., Watanabe, K., Kawamori, T., Ishikawa, F., Morotomi, M., Sugie, S., Toda, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Inhibitory effects of Bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinogenesis*, v. 21, n. 5, p. 937-41, 2000.

Record, I. R., Broadbent, J. L., King, R. A., Dreosti, I. E., Head, R. J., Tonkin, A. L. Genistein inhibits growth of B16 melanoma cells *in vivo* and *in vitro* and promotes differentiation in vitro. Int. J. Cancer, v. 72, n. 5, p. 860-64, 1997.

Register, B., Bethel, M.A., Thompson, N., Walmer, D., Blohm, P., Ayyash, L., Hughes, C. Jr. The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, coumestrol, and beta-sitosterol on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 208, n. 1, p. 72-7, 1995.

Reinli, K., Block, G. Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. Nutr. Cancer, 26, n.2, p. 123-48, 1996.

Risbridger, G. P., Wang, H., Frydenberg, M., Husband, A. The *in vivo* effect of red clover diet on ventral prostate growth in adult male mice. Reprod. Fertil. Dev., v. 13, n. 4, p. 325-29, 2001.

Saitoh, S., Sato, T., Harada, H., Takita, T. Transfer of soy isoflavone into egg yolk of chickens. Biosc. Biotechnol. Biochem., v. 65, n. 10, p. 2200-25, 2001.

Saloniemi, H., Wahala, K., Nykanen-Kurki, P., Kallela, K., Saastamoinen, I. Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 208, n. 1, p.13-7, 1995

Setchell, K. D. R., Borriello, S. P., Hulme, P. Kirk, D. N. Axelson, M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 40, n. 3, p. 569-78, 1984.

Setchell, K. D. R., Gosselin, S. J., Welsh, M. B., Johnston, J. O., Balistreri, W. F., Kramer, L. W., Dresser, B. L., Tarr, M. J. Dietary estrogens – A probable cause of infertility and liver disease in captive Cheetahs. *Gastroenterol.*, v. 93, n. 2, p. 225-33, 1987.

Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J. E. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, v. 350, n. 9070, p.23-27, 1997.

Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J. E. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 68, Suppl 6, p. 1453S-61S, 1998.

Sharpe, R. M. Falling sperm counts in men – is there an endocrinologic cause? *J. Endocrinol.*, v. 137, n. 3, p. 357-60, 1993.

Sharpe, R. M., Skakkebaek, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, v. 341, n. 8857, p. 1392-95, 1993.

Srilatha, B., Adaikan, T. G. Estrogen and phytoestrogen predispose to erectile dysfunction: ER-alpha and ER-beta in the cavernosum play a role? *Urology*, v. 63, n. 2, p. 382-6, 2004.

Strauss, L., Makela, S., Joshi, S., Huhtaniemi, I., Santti, R. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 144, n. 1-2, p. 83-93, 1998.

Strom, B. L., Schinnar, R., Ziegler, E. E., Barnhart, K. T., Sammel, M. D, Macones, G. A., Stallings, V. A., Drulis, J. M., Nelson, S. E., Hanson, S. A. Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA.*, v. 286, n. 7, p. 807-14, 2001.

Thigpen, J. E., Setchell, K. D., Ahlmark, K. B., Locklear, J., Spahr, T. Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab. Anim. Sci.*, v. 49, n. 5, p. 530-36, 1999.

Wisniewski, A. B., Klein, S. L., Lakshmanan, Y., Gearhart, J. P. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *J. Urol.*, v. 169, n. 4, p. 1582-86, 2003.

White, L. R., Petrovitch, H., Ross, G. W., Masaki, K, Masaki, J., Hardman, J., Nelson, J., Davis, D., Markesbery, W. Brain aging and midlife tofu consumption, *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 19, n. 2, p. 242-45, 2000.

Whitten, P. L., Lewis, C., Naftolin, F. A phytoestrogens diet induces the premature anovulatory syndrome in lactationally exposed female rats. *Biol. Reprod.*, v. 49, n. 5, p. 1117-21, 1993.

Whitten, P. L., Patisaul, H. B., Young, L. J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 24, n. 1, p. 47-54, 2002.

Woclawek-Potocka, I., Bah, M. M., Korzekwa, A., Piskula, M. K., Wiczowski, W., Depta, A., Skarzynski, D. J. Soybean-derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during cattle estrous cycle and early pregnancy. *Exp. Biol. Med.*, v. 230, n. 3, p. 189-99, 2005.

Xu, X., Wang, H. J, Murphy, P. A., Hendrich, S. Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. *J. Nut.*, v. 130, n. 4, p. 798 – 801, 2000.

Yamakoshi, J., Piskula, M. K., Izumi, T., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S. Obata, A., Kikuchi, M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J. Nutr.*, v. 130, n. 8, p. 1887-93, 2000.

Yellayi, S. N. A., Szewczykowski, M. A., Sato, T., Woods, J. A., Chang, J., Segre, M., Allred, C. D. , Helferich, W. G. , Cooke, P. S. The phytoestrogen genistein induces thimic and immune changes: A human health concern? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, n. 11, p 7616-7621, 2002.

5. ANEXOS

Anexo 1. Termo de aprovação para a utilização de animais em estudo científico.

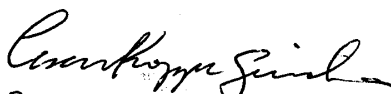


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA - IBD
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

23 de Maio de 2003.

A QUEM POSSA INTERESSAR

Declaramos que o projeto intitulado **“ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO DE COELHOS MACHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA BRANCO SUBMETIDOS À INGESTÃO DE FITOESTRÓGENOS EM DIETAS CONTENDO SOJA E ALFAFA”**, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Cesar Koppe Griso a
Comitê de Ética do Uso Animal
Presidente