

Área: Ciência de Alimentos

**EVIDÊNCIAS DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM RATOS
TRATADOS COM DIETA RICA EM LEITE DE SOJA NO PERÍODO
PRÉ-PUBERTAL**

**Jessica Nardi^{*a}, Patricia Bonamigo Moras^a, Carina Koeppe^a, Eliane Dallegrave^b,
Luciana Grazziotin Rossato^a**

^aLaboratório de Toxicologia, Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

^bUniversidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS

**E-mail: nardi.je@gmail.com*

RESUMO – A intolerância à lactose é uma doença caracterizada pela deficiência ou pouca quantidade da enzima que faz a digestão deste açúcar presente no leite. A principal forma de tratamento é a substituição de leite de vaca por leite de soja. Estudos e relatórios de órgãos regulatórios revelaram que o glifosato utilizado como herbicida na cultura da soja pode estar presente no grão em quantidade maior do que o permitido. Existe um grande número de crianças intolerantes à lactose que utilizam leite de soja como principal alimento, e por terem uma menor massa corporal e estarem em fase de desenvolvimento, estão proporcionalmente mais expostas a danos que este herbicida pode causar. Este trabalho procurou avaliar a toxicidade pubertal de um herbicida à base de glifosato, que foi administrado em leite de soja a ratos Wistar machos no período pré-pubertal, com início aos 23 dias de vida dos animais. Foi observado efeitos de desregulação endócrina evidenciados pela diminuição dos níveis de testosterona nos grupos tratados com glifosato (50 e 100 mg/Kg) e também no grupo tratado com leite de soja sem suplementação, quando comparados ao controle. Nos animais tratados com leite suplementado com glifosato, observou-se diminuição na contagem de espermátides em relação ao controle.

Palavras-chave: leite de soja, glifosato, desregulação endócrina.

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 50% dos adultos no mundo apresentam certa intolerância a lactose, problema que ocorre devido a dificuldade da enzima lactase digerir este carboidrato (RICKLI e ANDREAZZI, 2010). Nos primeiros meses de vida, indivíduos normais apresentam maior atividade da enzima lactase, e sua atividade cai gradativamente em todos seres humanos com o crescimento. Porém, alguns indivíduos apresentam o problema nos primeiros meses de vida (MATTAR e MAZO, 2010). O tratamento principal para intolerância à lactose é a exclusão ou diminuição de leite e produtos lácteos da alimentação, e uma opção muito utilizada é a substituição do leite normal pelo leite de soja, sendo assim amplamente utilizado por lactantes e crianças que apresentam o

problema (MOREIRA e ROMÁN, 2006; BRASIL, 2014). A soja apresenta um alto nível de proteínas, possui vitaminas do complexo B, minerais como: cálcio, ferro, potássio, e zinco, ácidos graxos e as isoflavonas, também chamadas de fitoestrógenos por apresentarem estrutura semelhante a estrógenos humanos. Nos derivados da soja a composição é basicamente a mesma, o que mudam são as concentrações de acordo com os processos industriais que são utilizados (SILVA, 2008; BRASIL, 2014).

O glifosato é um herbicida amplamente utilizado na cultura de soja para o controle de ervas daninhas (BRASIL, 2014 a). Estudos sugerem que o herbicida glifosato e suas formulações comerciais são substâncias potencialmente prejudiciais ao sistema endócrino, especialmente as formulações contendo Polioxietilamina (POEA), mesmo em concentrações muito abaixo das que são consideradas aceitáveis (DALLEGRAVE, *et al.*, 2002; DALLEGRAVE, 2003). Este herbicida pode apresentar resíduos no grão em quantidade maior do que a permitida, os quais podem ser transferidos para os produtos industrializados produzidos a partir desses grãos (PIGOSSO, *et al.*, 2008).

A Ingestão Diária Aceitável (IDA) corresponde à quantidade máxima da substância que, se for ingerida diariamente durante toda a vida, não oferece risco à saúde. Para o glifosato, a IDA é de 0,042mg/kg, porém esse valor é calculado com base em um indivíduo adulto com cerca de 60kg (BRASIL, 2014). Sabe-se que o leite de soja é a principal alternativa aos indivíduos intolerantes à lactose (RICKLI e ANDREAZZI, 2010), sendo assim, bebês com intolerância à lactose são expostos a uma concentração relativa de glifosato superior ao restante da população, considerando sua menor massa corporal e alimentação exclusivamente láctea. Além disso, esta exposição acontece durante um período importante para o desenvolvimento. Tendo em vista estes aspectos, o presente projeto teve como objetivo avaliar a desregulação endócrina e toxicidade reprodutiva em ratos machos jovens submetidos à dieta rica em soja e no herbicida glifosato em período pré-pubertal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produtos comerciais

Para a realização do experimento, foi utilizado o Roundup Original[®], fabricado pela Monsanto. O leite de soja utilizado foi adquirido no mercado, sendo escolhido o de maior teor de proteínas que é de 5,2g por porção de 200mL, da marca Ades[®].

2.2 Modelo experimental

Os estudos foram conduzidos em machos de ratos Wistar com 23 dias, que foram divididos em 4 grupos (n= 6 animais nos grupos controle e n= 7 nos grupos tratados com adição de glifosato). Os animais receberam o tratamento por via oral (gavagem), diariamente, por 35 dias. O grupo controle recebeu solução salina, o grupo controle do leite recebeu leite de soja não suplementado, o grupo glifosato 50 recebeu leite de soja suplementado com Roundup[®] na dose de 50mg/kg e o grupo glifosato 100 recebeu leite de soja suplementado com Roundup[®] na dose de 100mg/kg. As doses do estudo foram definidas a partir de resultados em estudos preliminares (DALLEGRAVE, 2003). Os animais foram acondicionados em caixas individuais para

controle individualizado dos consumos de ração e água (fundamentais para a avaliação toxicológica completa). A massa corporal relativa dos animais foi avaliada diariamente e também foram feitas avaliações clínicas do estado dos animais, avaliando a ocorrência de sinais de toxicidade como piloereção, diarreia, palidez nas mucosas, presença de cianose, dor abdominal e função respiratória. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo (Parecer CEUA 008/2014).

Os animais foram eutanasiados após os 35 dias de tratamento, durante a puberdade (que ocorre aos 65 dias). A eutanásia foi realizada após indução da anestesia com ketamina/xilasina (100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente).

2.3 Avaliações Bioquímicas

Após a coleta o sangue foi acondicionado em tubo com gel separador e encaminhado ao laboratório, para análise dos níveis de testosterona e T_4 livre, conforme recomendado no ensaio de toxicidade pubertal da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (OECD, 2010). Esse estudo é desenhado para identificar compostos químicos que tem potencial para interação com modalidades mediadas por receptores andrógenos, mediadas por hormônio da tireóide e que interfiram com a formação de hormônios. Também detecta compostos que podem alterar o desenvolvimento pubertal através de mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, em que os animais são expostos ao composto químico durante o período pré-pubertal, que é altamente sensível à exposição a agentes que possam desregular o sistema endócrino (OECD, 2010).

3.4 Avaliação das espermátides resistentes à homogeneização

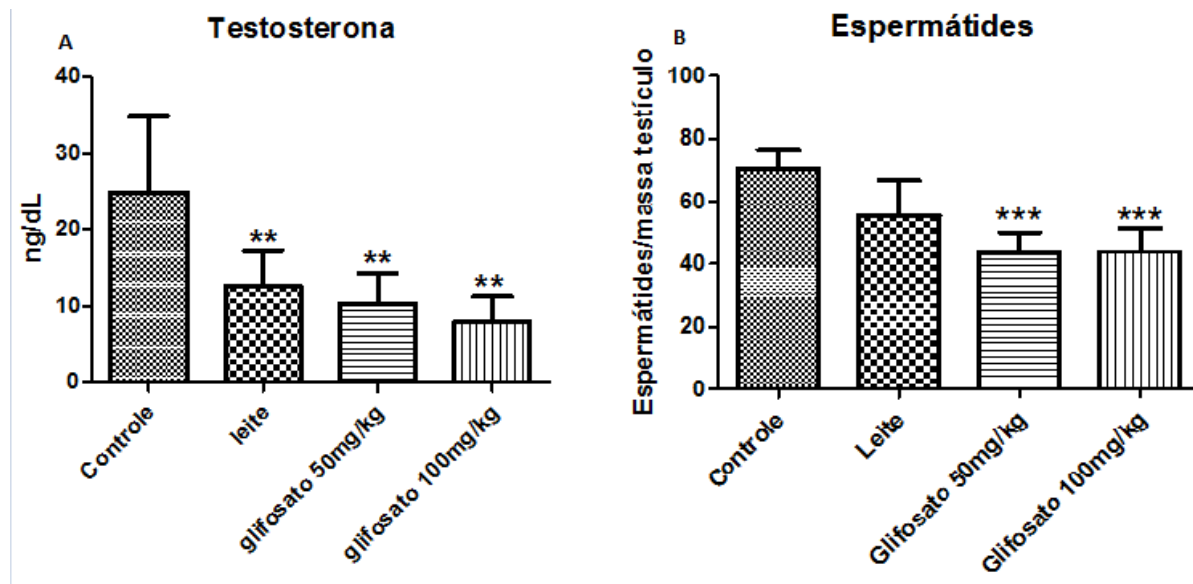
Os testículos foram excisados e após foi mensurada sua massa e relacionada à massa corporal de cada indivíduo. Os testículos foram liberados da túnica albugínea, mergulhados em 10ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, com Triton X-100 a 0,05%, e homogeneizados em velocidade média, por um minuto. Cem microlitros do homogeneizado de cada testículo foram diluídos em 900 μ l de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após a diluição, o número de espermátides (células precursoras de espermatozoides) resistentes à homogeneização (estágios de 17 a 19) foi contado em câmara de Neubauer.

3 RESULTADOS

Os ratos tratados com leite de soja (com ou sem suplementação do glifosato) apresentaram níveis diminuídos de testosterona com relação aos animais controle, conforme evidenciado na Figura 1A. A contagem de espermátides resistentes à homogeneização demonstrou diminuição nos grupos tratados com glifosato quando comparados aos animais do grupo controle, conforme observado na Figura 1B. Não houve diferença significativa em relação à massa corporal relativa, ao consumo de água e de ração ou sinais clínicos de toxicidade sistêmica

nos grupos tratados ao longo da experiência. Na dosagem de T4 livre no soro dos animais não se observou diferenças significativas entre os grupos.

Figura 1- A) Dosagem de testosterona, B) Número de espermátides/massa do testículo. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados através de One-Way ANOVA e Bonferroni como post teste (** $p < 0.01$ vs Controle e *** $p < 0.001$ vs Controle).



4 DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram a diminuição significativa dos níveis de testosterona e no número de espermátides observadas nos animais tratados com leite de soja e suplementação com glifosato. Em estudo prévio, ratos expostos à formulação comercial do glifosato durante toda a gestação (21 a 23 dias) e durante a lactação (21 dias) (doses de 50, 150 e 450mg/kg) apresentaram sinais de toxicidade reprodutiva caracterizada por diminuição de espermátides alongadas e presença de vacuolização das espermátides dos animais expostos a 150 e 450mg/kg. Também constatou-se aumento significativo no percentual de espermatozoides anormais (DALLEGRAVE, 2003). Da mesma forma, já foi demonstrado que a exposição ao glifosato (0, 5, 50 e 250mg/kg) durante o período de 23 a 53 dias de idade causou uma diferença significativa com relação à idade em que os ratos atingiram a puberdade, sugerindo que a exposição crônica ao glifosato-Roundup provoca uma desregulação endócrina no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (ROMANO, *et al.*, 2008). A diminuição significativa nos níveis de testosterona observada no presente trabalho sugere uma desregulação do eixo hipotálamo-hipófise ou um efeito direto sobre as células de Leydig, conforme já foi evidenciado em estudo anterior, onde o Roundup[®] demonstrou-se capaz de inibir a formação de hormônios esteroides através da desregulação da expressão de proteínas regulatórias em células de Leydig tumorais de ratos (WALSH *et al.*, 2000). A diminuição dos níveis de testosterona pode justificar a diminuição das espermátides uma vez que este hormônio é essencial para que a espermatogênese passe das etapas de espermatócitos, espermátides até espermatozoides (VALDEOLIVAS, 2003; GUYTON, 1988).

Considerando que também houve diminuição da testosterona nos animais tratados apenas com leite de soja (não suplementado com glifosato, mas contendo uma quantidade residual desconhecida de glifosato),

podemos ter outra explicação para a grande diminuição nos níveis de testosterona: o tratamento utilizando leite de soja. A soja contém isoflavonas como a genisteína e daidzeína. Estas isoflavonas também são chamadas de fitoestrógenos, pois têm a estrutura semelhante a estrógenos humanos como 17 β -estradiol (BRASIL, 2006). A genisteína e daidzeína são consideradas como substâncias estrogênicas quando ingeridas. Em estudos onde ratos foram tratados com dieta à base de soja contendo estas isoflavonas, houve um aumento da atividade proliferativa das células de Leydig quando os animais foram expostos no período neonatal, do 2º ao 21º dia do pós parto (HEEJUN, *et al.*, 2013; NAPIER, *et al.*, 2013). Porém, apesar da proliferação das células de Leydig, houve diminuição dos níveis de testosterona no soro (NAPIER, *et al.*, 2013). Considerando a relevância destes resultados para o desenvolvimento sexual masculino, mais estudos são necessários a fim de elucidar até que ponto o leite de soja é capaz de promover efeitos deletérios *per se*, ou se o efeito observado com o tratamento com leite de soja está relacionado aos resíduos de glifosato presentes.

5 CONCLUSÃO

Foi possível evidenciar os efeitos desreguladores endócrinos do glifosato em um regime de administração pré-adolescência. Além dos efeitos diretos nos níveis de testosterona que também foram observados nos animais tratados apenas com leite de soja, observou-se uma diminuição significativa na quantidade de espermátides nos animais que receberam leite de soja suplementado com glifosato. Com base nesses resultados, podemos concluir que a exposição ao herbicida glifosato neste regime de administração foi capaz de alterar drasticamente a qualidade do sêmen dos ratos. A partir destes resultados, mais estudos são necessários para avaliar o real contributo dos fitoestrógenos para este resultado e também a fim de interpolar os resultados para os seres humanos e definir o real impacto da dieta rica em soja e com resíduos de glifosato em um período crucial do desenvolvimento sexual.

6 REFERÊNCIAS

- BRASIL. **Exposição Crônica aos Agrotóxicos: Avaliação do Risco Dietético** [s. d.] Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Toxicologia. <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/tallerplagui/brasilLidiaNunesGoncalves.pdf>. Acessado em: 11 de set. de 2014.
- BRASIL. **Agrotóxicos** (2014^a) Ministério do Meio Ambiente <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos> Acessado em: 16 de out. de 2014.
- BRASIL. **Importância dos fitoestrógenos presentes na soja, para a saúde humana** (2006) Ministério do Meio Ambiente, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Queiroz_Nogueira_Scramin_importanciaID-5nX98pWTxk.pdf Acessado em: 23 de out. de 2014.
- DALLEGRAVE, E. **Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup® em ratos wistar**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

- DALLEGRAVE, E., MANTESE, F.D., DALSENTER, P.R. *et al.* Oral acute toxicity of glyphosate in Wistar rats. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 1, p. 29-34, 2002.
- GUYTON, A.C. **Fisiologia Humana**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1988.
- HEEJUN, C.; KANGWOO, C.; HYUKJUN, F. *et al.* Effect of genistein administration on the recovery of spermatogenesis in the busulfan-treated rat testis. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 1, p. 60-66, 2013.
- NAPIER, I.D.; SIMON, L.; PERRY, D. *et al.* Testicular Development in Male Rats Is Sensitive to a Soy-Based Diet in the Neonatal Period. **Biol Reprod**, v. 40, p. 1-12, 2013.
- OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development (2010) **Guidance Document on the Assessment of Chemicals for Endocrine Disruptors**. 9: 260-277. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/46436593.pdf> Acessado em: 10 abr. 2014.
- PIGOSSO, G.; GENOVESSE, M.I.; TRICHEZ, V. *et al.* Resíduo de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 e BRS 154. **Cien Tecnol Aliment**, v. 28, p. 192-197, 2008.
- RICKLI, C. B.; ANDREAZZI M. A. Intolerância a lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. In: V MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. , 2010. Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá: CESUMAR- Centro Universitário de Maringá, 2010, 5 p. Disponível em: <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/quin_mostra/cristiane_rickli_barbosa_1.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2014.
- ROMANO, R.M.; ROMANO, M.A.; MOURA, M.O., *et al.* A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, p. 481-487, 2008.
- SILVA, D. T. **Extrato de soja: características, métodos de obtenção e compostos benéficos a saúde humana**. 2008. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.
- VALDEOLIVAS, S.M.M. Análise morfofuncional testicular, com ênfase na avaliação do processo espermatogênico normal e anormal. **Universidade Federal de São Paulo**, 2003.
- WALSH, L.P.; McCORMICK, C.; MARTIN, C.; *et al.* Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environ Health Perspec**, v. 108, p. 769-776, 2000.