

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JEANE MARIA DE OLIVEIRA

MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GONADOTROFINAS
APÓS A EXPOSIÇÃO PRÉ-PÚBERE A ISOFLAVONAS

Guarapuava

2020

JEANE MARIA DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GONADOTROFINAS
APÓS A EXPOSIÇÃO PRÉ-PÚBERE A ISOFLAVONAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, área de Concentração fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia, da UNICENTRO.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renata Marino Romano

Guarapuava

2020

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

O48m Oliveira, Jeane Maria de
Modulação da produção de gonadotrofinas após a exposição pré-púbere a isoflavonas / Jeane Maria de Oliveira. -- Guarapuava, 2020.
xiii, 70 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2020.

Orientadora: Renata Marino Romano
Banca examinadora: Renata Marino Romano, Luciana Erzinger Alves de Camargo, Kelly Cristina Nogueira Soares

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Isoflavonas. 3. Desregulador endócrino. 4. Eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

TERMO DE APROVAÇÃO

Jeane Maria de Oliveira

“Modulação da produção de gonadotrofinas após a exposição pré-púbere a isoflavonas”.

Dissertação aprovada em 19/02/2020 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

Reprodução com autorização pelo site: www.unicentro.br



Prof.^a Dr.^a Renata Marino Romano, UNICENTRO.
Presidente



Prof.^a Dr.^a Luciana Erzinger Alves de Camargo, UNICENTRO.
Membro



Prof.^a Dr.^a Kelly Cristina Nogueira Soares.
Membro

Guarapuava - PR
2020.

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Salvatore Renza – Padre Salvador, 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR

Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 09 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR
Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR

Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 005/2017 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 27 de maio de 2017.

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: "*Ação Hormonal de Isoflavonas na pré-puberdade e puberdade infantil em Ratos Wistar como modelo experimental endócrino*", protocolo número 007/2017, foi analisado e considerado **APROVADO SEM REAVALIAÇÃO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária do dia 07 de abril de 2017.

2. Deverá ser encaminhado ao CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:

Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados ao CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.

Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.

Qualquer alteração na pesquisa que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

Pesquisador: Prof. Marco Aurélio Romano.
Atenciosamente,


Presidente do CEUA

Ao senhor
Prof. Marco Aurélio Romano.
UNICENTRO-CEDETEG

Dedico este trabalho à minha família que sempre me apoia em minhas decisões e em especial aos meus pais Lucia e Zamir por toda ajuda e por tornar os meus sonhos em realidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Santo Expedito, em quem tenho imensa fé, por sempre guiarem meus caminhos e atenderem as minhas preces.

À minha família por todo suporte e incentivo no meu crescimento e educação, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e por serem meu exemplo de vida! Sem vocês nada disso seria possível.

À Professora Dra. Renata Marino Romano, por todo tempo e dedicação para ensinar e orientar. Obrigada por acreditar e confiar esse desafio a mim e pela grande oportunidade de fazer parte de um grupo tão grande e importante na pesquisa.

Aos meus amigos de vida e aos amigos que fiz no laboratório, obrigada por toda ajuda, seja por um abraço, uma palavra, uma ajuda na escrita ou nos experimentos. Por todo o incentivo, por estarem ao meu lado nas horas difíceis. Nos momentos em que estamos longe da família os amigos se tornam família.

A todos que de alguma maneira contribuíram pra que eu chegasse até aqui, meu muito obrigada!

RESUMO

As isoflavonas são fitoestrogênios presentes em leguminosas, principalmente na soja, estas possuem uma estrutura similar ao 17β -estradiol endógeno e por isso apresentam habilidade de interagir com receptores de estrogênio e desencadear ações tanto estimulantes quanto inibitórias. Devido a esse fato, as isoflavonas (genisteína, daidzeína e gliciteína) podem ter efeito potencial de desregulador endócrino sobre a função reprodutiva alterando hormônios e genes envolvidos no eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (HHT), especialmente, se a exposição a esse composto ocorre na fase crítica de pré-puberdade, onde o *imprinting* hormonal acontece. Os desequilíbrios hormonais nessa fase podem levar a distúrbios na saúde do adulto apoiando o conceito atual da Origem do Desenvolvimento da Saúde e Doença (DOHaD). O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes e hormônios relacionados ao controle do eixo HHT após a exposição a isoflavonas (ISO) ou genisteína (GEN) isolada em ratos Wistar machos durante o período pré-púbere, afim de investigar os efeitos dessas substâncias sobre a função reprodutiva. Quarenta e dois ratos foram divididos em 3 grupos: grupo controle, que recebeu somente óleo de milho; grupo exposto a 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas; grupo exposto a 0,5 ou 5 mg/kg de genisteína. A administração das soluções foi realizada por gavagem, uma vez ao dia com um volume de 0,25 ml/100g de peso corporal, sempre pela manhã, do 23º aos 60 dias de idade. Ao final dos 60 dias, os animais foram eutanasiados sob anestesia geral e em seguida os tecidos foram coletados e armazenados. Foram feitas as dosagens séricas do hormônio luteinizante (LH), do hormônio folículo estimulante (FSH) e de testosterona. No hipotálamo foram avaliados a expressão gênica do hormônio liberador de gonadotrofinas (*Gnrh1*), receptor de estradiol alpha (*Esr1*) e beta (*Esr2*) e receptor de andrógeno (*Ar*). Na hipófise, foram avaliados a expressão gênica do receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas (*Gnrhr*), *Lhb*, *Fshb*, *Esr1*, *Esr2* e *Ar*. Nos testículos, foram avaliados a expressão gênica do receptor de hormônio luteinizante (*Lhcgr*), o receptor do hormônio folículo estimulante (*Fshr*) e a inibina beta (*Inhbb*). As análises estatísticas foram submetidas aos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Bartle. Os parâmetros foram avaliados pela ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey HSD. A exposição pré-púbere a isoflavonas e genisteína levou a alterações com diferentes respostas na expressão de genes envolvidos na função reprodutiva. Houve atraso de entrada na puberdade e aumento no peso nesta fase. No hipotálamo, a expressão do *Esr1* foi aumentada na exposição a ISO, enquanto que a expressão do *Esr2* diminuiu na exposição a GEN. Na hipófise, o *Gnrhr* aumentou com ambas as isoflavonas, o gene *Lhb* e o *Ar* diminuíram na exposição a ISO, já o gene *Fshb* reduziu com a GEN. Nos testículos a expressão de *Lhcgr* aumentou em ambos os grupos tratados. As concentrações séricas de LH, FSH, testosterona e estradiol também foram alteradas. Diante do exposto pode-se concluir que a exposição a isoflavonas e a genisteína isolada na idade pré-púbere compromete a atividade normal do eixo HHT podendo resultar em comprometimento da função reprodutiva masculina.

Palavras-chave: Isoflavonas, Desregulador endócrino, Eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular.

ABSTRACT

Isoflavones are phytoestrogens present in legumes, mainly soybeans, and they have a structure similar to endogenous 17β -estradiol and therefore have the ability to interact with estrogen receptors and trigger both stimulating and inhibitory actions. Due to this fact, isoflavones (genistein, daidzein, glycitein) may have a potential endocrine disrupting effect on reproductive function by altering hormones and genes involved in the hypothalamic-pituitary-testicular axis (HPT), especially if exposure to these compounds occurs in the critical phase of prepubertal, where hormonal imprinting happens. Hormonal imbalances at this stage can lead to disturbances in adult health supporting the current concept of Origin of Health and Disease Development (DOHaD). The aim of this study was to evaluate the expression of genes and hormones related to HHT axis control after exposure to isoflavone (ISO) or genistein (GEN) isolatedly in male Wistar rats during the prepubertal period, in order to investigate the effects of these substances on the reproductive function. Forty-two rats were divided into 3 groups: control group, which received only corn oil; group exposed to 0.5, 5 or 50 mg /kg isoflavone; group exposed to 0.5 or 5 mg /kg genistein. The solutions were administered by gavage, once a day, with a volume of 0.25 ml / 100g body weight, always in the morning, from the 23rd to the 60th day of age. At the end of 60 days, the animals were euthanized under general anesthesia and then the tissues were collected and stored. Serum dosages of luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and testosterone were measured. In the hypothalamus, the gene expression of gonadotropin releasing hormone (*Gnrh1*), estradiol receptor alpha (*Esr1*) and beta (*Esr2*) and androgen receptor (*Ar*) were evaluated. In the pituitary, the gene expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor (*Gnrhr*), *Lhb*, *Fshb*, *Esr1*, *Esr2* and *Ar* were evaluated. In the testis, the gene expression of the luteinizing hormone receptor (*Lhcgr*), stimulating follicle receptor (*Fshr*) and inhibin beta (*Inhbb*) were evaluated. Statistical analyzes were subjected to Kolmogorov-Smirnov normality tests and homoscedasticity tests by Bartle's test. The parameters were evaluated by ANOVA followed by Tukey HSD post-test. Prepubertal exposure to isoflavones and genistein led to changes with different responses in the expression of genes involved in reproductive function. There was a delay in the age in which animals entered in puberty, and increase in their weight. In the hypothalamus, the *Esr1* expression was increased on ISO exposure, while *Esr2* expression decreased on GEN exposure. In the pituitary, *Gnrhr* increased with both isoflavones, *Lhb* gene and *Ar* decreased on ISO exposure, while *Fshb* gene decreased with GEN. In the testicles *Lhcgr* expression increased in both treated groups. Serum concentrations of LH, FSH, testosterone and estradiol were also changed. Given the above results, it can be concluded that exposure to isoflavone and isolated genistein at prepubertal age compromises the normal activity of the HPT axis and may result in impaired male reproductive function.

Keywords: Isoflavones, Endocrine disruptor, Hypothalamic-pituitary-testicular axis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Ontogenia dos receptores e hormônios envolvidos na regulação do eixo HHT.	23
Quadro 2- Oligonucleotídeos <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) de cada gene utilizados para o ensaio de PCR em tempo real e as respectivas sequências de referência.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular. Imagem criada com aplicativo Bio Render. Fonte: https://biorender.com/	21
Figura 2- Comparação entre as estruturas químicas do 17 β -estradiol, das isoflavonas e genisteína isolada. Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Isoflavone, CID=72304, Estradiol, CID=5757, Genistein, CID=5280961, (accessed on May 8, 2019).	30
Figura 3- Representação gráfica da evolução do peso corporal de ratos tratados com isoflavonas nas doses de 0,5, 5 ou 50 mg/kg, ou genisteína nas doses de 0,5 ou 5 mg/kg e ratos do grupo controle. A análise foi realizada do PND 23 ao PND 60	41
Figura 4- Idade à puberdade (dias) do grupo tratado com isoflavonas (A) e genisteína (B), e peso à puberdade (g) do grupo tratado com isoflavonas (C) e genisteína (D) durante o período pré-púbere	42
Figura 5- Expressão hipotalâmica dos transcritos de <i>Gnrh1</i> (A,B) e expressão hipofisária dos transcritos de <i>Gnrhr</i> (C,D) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas, ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína	43
Figura 6- Expressão hipofisária dos transcritos de <i>Lhb</i> (A,B), nível de LH sérico (C,D) e expressão testicular dos transcritos de <i>Lhcgr</i> (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas, ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína	44
Figura 7- Expressão hipofisária dos transcritos de <i>Fshb</i> (A,B), nível de FSH sérico (C,D) e expressão testicular dos transcritos de <i>Fshr</i> (E,F) e <i>Inhbb</i> (G,H) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas, ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína	46
Figura 8- Nível de testosterona sérica (A,B), expressão testicular de aromatase (C,D) e estradiol sérico (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50mg/kg de isoflavonas ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína	48
Figura 9- Expressão hipotalâmica dos transcritos de <i>Ar</i> (A,B), <i>Esr1</i> (C,D) e <i>Esr2</i> (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína	49
Figura 10- Expressão hipofisária dos transcritos de <i>Ar</i> (A,B), <i>Esr1</i> (C,D) e <i>Esr2</i> (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50mg/kg de isoflavonas ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína	50
Figura 11- Resumos dos resultados. A) exposição a ISO e B) exposição a GEN.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação dos estágios de desenvolvimento em ratos e humanos.	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AdipoR1	Receptor de adiponectina 1
AdipoR2	Receptor de adiponectina 2
<i>Ar</i>	Receptor de andrógeno
cDNA	DNA complementar
DHT	Di-hidrotestosterona
DOHaD	Origem do desenvolvimento da Saúde e da Doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDCs	Desreguladores endócrinos
EDSTAC	Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee
E.P.M	Erro padrão da média
<i>Ers</i>	Receptores de estrógeno
<i>Esr1</i>	Receptor de estradiol alpha
<i>Esr2</i>	Receptor de estradiol beta
FSH	Hormônio folículo estimulante
<i>Fshb</i>	Gene do hormônio folículo estimulante
<i>Fshr</i>	Receptor do hormônio folículo estimulante
GD	Dias de gestação
GEN	Genisteína
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>Gnrhr</i>	Receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>Gnrh1</i>	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPR54	Receptor acoplado a proteína G
GW	Semana de gestação
HHG	Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal
HHT	Eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular
<i>Inhbb</i>	Inibina beta
ISO	Isoflavonas
<i>Kiss1r</i>	Receptor da kisspeptina
LH	Hormônio luteinizante
<i>Lhb</i>	Gene do hormônio luteinizante
<i>Lhcgr</i>	Receptor do hormônio luteinizante

LOAEL	Nível mais baixo de efeito adverso observado
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PND	Dia pós-natal
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
<i>Rpl19</i>	Proteína ribossomal L19
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteróide desidrogenase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular	18
2.2 Desenvolvimento e Puberdade	21
2.3 Isoflavonas	27
2.4 Desreguladores endócrinos	30
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral e Hipótese central	33
3.1.1 <i>Objetivo geral</i>	33
3.1.2 <i>Hipótese central</i>	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Manejo dos animais	34
4.2 Delineamento experimental	34
4.3 Colheita de tecidos	35
4.3.1 <i>Sangue</i>	35
4.3.2 <i>Colheita de tecidos para biologia molecular</i>	35
4.4 Identificação das alterações de expressão gênica pela quantificação do mRNA	35
4.4.1 <i>Homogeneização e extração de RNA total dos tecidos</i>	35
4.4.2 <i>Reação de transcrição reversa</i>	36
4.4.3 <i>Confecção dos oligonucleotídeos (primers)</i>	36
4.4.4 <i>Reação de quantificação por PCR em tempo real</i>	38
4.5 Curva de crescimento, idade e peso a puberdade	39
4.6 Dosagens hormonais	39
4.7 Análise Estatística	39
5. RESULTADOS	40
5.1 Crescimento e puberdade	40
5.2 <i>Gnrh1</i> e <i>Gnrhr</i>	42
5.3 <i>Lhb</i>, LH sérico e <i>Lhcgr</i>	43
5.4 <i>Fhsb</i>, FSH sérico, <i>Fshr</i> e <i>Inhbb</i>	45
5.5 Testosterona sérica, Aromatase e Estradiol sérico	47
5.6 <i>Ar</i>, <i>Esr1</i> e <i>Esr2</i> no hipotálamo	48
5.7 <i>Ar</i>, <i>Esr1</i> e <i>Esr2</i> na hipófise	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da vida o organismo passa por inúmeros processos de mudanças. As interações físico-químicas que ocorrem nas moléculas constroem caminhos bastante complexos que mudam com o passar do tempo. O crescimento até a fase adulta é marcado pelo aumento da massa corporal, maturação e mudanças à nível endócrino que influenciam a forma e a composição corporal, bem como metabolismo e comportamento, durante os períodos críticos de pré-puberdade e puberdade (MANTOVANI; FUCIC, 2014).

A pré-puberdade é um período considerado chave no processo de maturação do corpo, bem como uma janela potencialmente suscetível a exposições químicas. O equilíbrio de hormônios estrogênicos/androgênicos é um fator importante em todo o processo da puberdade, interagindo com os fatores que regulam o crescimento e a maturação de todos os órgãos e sistemas durante esse período, sendo que uma desregulação nesse sistema pode resultar em aumento do risco de doença na vida adulta (KASPER-SONNENBERG et al., 2017)

Hormônios ou substâncias que possuem capacidade de causar uma perturbação hormonal podem interferir no desenvolvimento púbere por meio de ações em diferentes níveis, incluindo o eixo hipotalâmico-hipofisário neuroendócrino, as gônadas e órgãos-alvos periféricos (MOURITSEN et al., 2010).

Essas substâncias chamadas de desreguladores endócrinos são moléculas de produzidas pela indústria química ou produzidas de forma natural, por exemplo por plantas, que estão presentes no meio ambiente, podendo promover modificações adversas a nível endócrino, resultando em um impacto na saúde da população (COMBARNOUS; NGUYEN, 2019). Os desreguladores endócrinos foram associados a alterações em nível de reprodução, como por exemplo, comprometimento do processo de espermatogênese e menor contagem de espermatozoides na idade adulta (SLEIMAN et al., 2013), hipersecreção de andrógeno, aumento de atividade gonadal e da produção espermatozoide refletindo em alteração de comportamento e problemas histológicos e endócrinos (ROMANO et al., 2011), danos causados na membrana plasmática do espermatozoide e na integridade do acrossoma, bem como uma redução da atividade mitocondrial (MATHIAS et al., 2015) e modulação na expressão de genes relacionados ao eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (CAVALLIN et al., 2018).

Dentre as substâncias naturais que tem potencial desregulador estão os compostos presentes na alimentação. Fatores relacionados à dieta, como proteína animal podem ter

influência sobre a puberdade, porém a presença de fitoestrógenos em alimentos à base de soja está se tornando um fator ainda mais preocupante em relação a saúde (SEGOVIA-SIAPCO et al., 2017). Os fitoestrogenos são compostos estruturalmente semelhantes aos estrogênios (17 β -estradiol) e exercem efeitos tanto estimulatórios quanto inibitórios. Existem várias classes de fitoestrogenos e entre estas estão as isoflavonas e os cumestanos que possuem maior atividade hormonal ativa e são amplamente estudados (KŘÍŽOVÁ et al., 2019; PATISAUL, 2017).

As isoflavonas podem ser encontradas em plantas como o trevo vermelho, linhaça e soja. A soja é a fonte mais rica de isoflavonas e o seu teor presente pode variar de 1,2 a 4,2 mg/g (XIAO et al., 2018). A genisteína e a daidzeína são tipos de isoflavonas mais presentes na dieta humana e podem ser classificados como moduladores seletivos do receptor de estrogênio, possuindo a capacidade de desencadear atividade estrogênica para atuar como agonista ou antagonista dependendo do tecido, dos receptores e a concentração de estrogênios endógenos circulantes (GAFFER et al., 2018).

Alguns estudos pesam evidências a favor (HIRAMATSU et al., 2020; VAN DIE et al., 2014) e outros contra os benefícios à saúde e os efeitos adversos dos fitoestrógenos (CACERES et al., 2019; SHERRILL et al., 2010). Poucos estudos exploram a possibilidade de que o consumo de suplemento a base de proteína de soja possa afetar o desenvolvimento reprodutivo, bem como os possíveis efeitos sobre o início da puberdade (DUITAMA et al., 2018). Efeitos sobre as gônadas masculina e femininas ainda não são conclusivos, principalmente em relação a sua ação sobre a fertilidade (PATERNI; GRANCHI; MINUTOLO, 2017). Sendo assim, estudos investigando os efeitos de fatores nutricionais sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular são importantes, pois fornecem informações científicas sobre a contribuição das dietas para a saúde reprodutiva (ADEDARA et al., 2018).

Deste modo, em função da necessidade de maior entendimento sobre os efeitos das isoflavonas, este trabalho pretende investigar as ações de isoflavonas e genisteína isolada sobre a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular em ratos Wistar expostos a essas substâncias durante o período pré-púbere.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular

A reprodução é regulada pela ação de hormônios centrais e periféricos. O caminho final da função reprodutiva depende do funcionamento adequado do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (RUDOLPH et al., 2016). A fertilidade masculina e, portanto, seu potencial reprodutivo é o resultado de um complexo e intrincado controle neuroendócrino (CHIMENTO et al., 2014; KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018). Nos homens o eixo gonadal é dividido em hipotálamo, hipófise e testículo (HHT) (JIN; YANG, 2014).

A sinalização hormonal inicia-se no hipotálamo pela ação da Kisspeptina. A Kisspeptina pertence a família dos peptídeos RFamida e seus neurônios estão localizados na área pré-óptica rostral e núcleo infundibular. A Kisspeptina atua através do receptor acoplado à proteína G Kiss1r (GPR54) expresso nos neurônios do *Gnrh1* e estimula fortemente a secreção de gonadotrofinas, sendo assim, esta é um importante regulador da secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (*Gnrh1*) (KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018; PINEDA et al., 2017; RUDOLPH et al., 2016; SEONG et al., 2010).

O *Gnrh1* é um peptídeo com 10 aminoácidos secretado pelos neurônios, cujos corpos celulares se encontram no *núcleo arqueado do hipotálamo*. As terminações desses neurônios podem ser encontradas, principalmente, na eminência mediana do hipotálamo, onde liberam o *Gnrh1* no sistema vascular porta hipotalâmico-hipofisário. Sendo assim, o *Gnrh1* é transportado para a hipófise anterior na circulação porta hipofisária e liga-se a um receptor de membrana nos gonadotrofos da hipófise (*Gnrhr*) (KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018; STAMATIADES; KAISER, 2018).

A ligação de *Gnrh1* ao seu receptor desencadeia uma série complexa de eventos de transdução de sinal intracelular. Essa sinalização orchestra a resposta fisiológica geral dessas células ao estímulo do *Gnrh1* (BLISS et al., 2010). O *Gnrh1* secretado atua estimulando os gonadotrofos hipofisários para produzir as gonadotrofinas, o *hormônio folículo estimulante* (FSH) e o *hormônio luteinizante* (LH). Esses dois hormônios compartilham subunidades alfa comuns, mas diferem em suas subunidades beta específicas. Essas diferentes subunidades beta são importantes para as funções de LH e FSH relacionadas com a fertilidade (ADEDARA et al., 2018; JIN; YANG, 2014).

A secreção do *Gnrh1* pelo hipotálamo é feita de maneira periódica e pulsátil durante poucos minutos, intermitentemente, a cada 1 a 3 horas. A intensidade que esse estímulo

ocorre é dependente da frequência dos ciclos de secreção e pela quantidade de *Gnrhl* liberado a cada ciclo. A secreção de LH pela hipófise anterior é também acíclica, seguindo quase fielmente o padrão de liberação pulsátil do *Gnrhl*. Já a secreção de FSH aumenta e diminui apenas ligeiramente a cada flutuação de secreção do *Gnrhl* (JIN; YANG, 2014; STAMATIADES; KAISER, 2018).

O FSH e o LH liberados atingem as células presentes nos testículos (células de Sertoli e Leydig respectivamente) e medeiam suas ações individuais através de seus receptores, ambos acoplados a proteína G presente na membrana plasmática das células. Nos homens, a ligação do LH a seu receptor nas células de Leydig, (*Lhcgr*) influencia a síntese e secreção de andrógenos envolvendo a androstenediona, a di-hidrotestosterona (DHT) e a testosterona. A testosterona exerce ações sexuais e anabólicas e, além disso, participa da manutenção da espermatogênese por meio da sua ação parácrina nas células de Sertoli. A testosterona, produzida pelo estímulo do LH, ativa o receptor androgênico (*Ar*) em células de Sertoli para iniciar as respostas funcionais necessárias para a espermatogênese (ADEDARA et al., 2018; BLISS et al., 2010; JIN; YANG, 2014; KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018; ODUWOLE; PELTOKETO; HUHTANIEMI, 2018; RUDOLPH et al., 2016).

Já o FSH se liga a receptores na superfície das células de Sertoli (*Fshr*) nos túbulos seminíferos, fazendo com que essas células sofram maturação e secretem várias substâncias espermatogênicas. Simultaneamente, a testosterona que se difunde das células de Leydig nos espaços intersticiais para os túbulos seminíferos também possui um efeito trófico sobre a espermatogênese. Sendo assim, para que a espermatogênese ocorra se faz necessário tanto a presença do LH quanto da testosterona atuando em conjunto (BLISS et al., 2010; ODUWOLE; PELTOKETO; HUHTANIEMI, 2018).

Esses hormônios esteroides gonadais exercem uma regulação de retroalimentação negativa sobre a atividade do eixo HHT por ação tanto no hipotálamo como na hipófise. Várias evidências indicam que os esteroides testiculares, andrógenos e estrogênio, podem mediar as reações de retroalimentação sobre a secreção de gonadotrofinas interagindo com receptores de estrógeno (*Er*) ou receptores de andrógeno (*Ar*) presentes no hipotálamo e hipófise (CHIMENTO et al., 2014).

A testosterona pode mediar essa ação tanto direta quanto indiretamente. Grande parte dessa inibição provavelmente resulta de um efeito direto da testosterona sobre o hipotálamo, reduzindo a secreção de *Gnrhl*, que por sua vez diminui a produção de LH e FSH, e sobre a hipófise, diminuindo a secreção de LH, e conseqüentemente, levando a uma diminuição de secreção de testosterona pelos testículos. Essa ação se dá pela ligação da testosterona aos

receptores de andrógeno (*Ar*) presentes no hipotálamo e hipófise (CHIMENTO et al., 2014; SCOTT et al., 2000).

Por outro lado a testosterona pode sofrer ação de uma enzima chamada aromatase, localizada no retículo endoplasmático, e é convertida em estradiol (CARREAU; BOURAIMA-LELONG; DELALANDE, 2011; LITTLETON-KEARNEY; HURN, 2004; NETO et al., 2016). O estradiol é o estrogênio mais potente produzido no corpo e estes regulam o crescimento, diferenciação e a função em uma ampla gama de tecidos-alvo. O 17 β -estradiol é o estrogênio presente expresso em maior quantidade, porém, podem também serem encontrados em menor quantidade a estrona e estriol. O estrógeno produzido exerce ações de retroalimentação regulando a secreção do LH. Seus efeitos biológicos desempenhados são mediados pela ligação a receptores de estrogênio (*Er*), que são membros da superfamília de receptores nucleares (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005; SCOTT et al., 2000).

Os receptores de estrogênio possuem duas formas distintas, o *Esr1* (gene que codifica $ER\alpha$) e *Esr2* (gene que codifica $ER\beta$) (FAULDS et al., 2012). O *Esr1* é principalmente expresso em tecidos reprodutivos, rim, osso, tecido adiposo e fígado, enquanto que o *Esr2* é expresso no ovário, próstata, pulmão, trato gastrointestinal, bexiga, células hematopoiéticas e no sistema nervoso central (SNC) (CLEGG et al., 2017). As duas formas dos *Ers* também podem ser encontradas em regiões do hipotálamo e da hipófise anterior. Sendo assim, o estrogênio se liga a esses receptores e medeia a ação de infra regulação sobre o *Gnrh1* no hipotálamo e sobre o LH na hipófise (CHIMENTO et al., 2014; SCOTT et al., 2000).

Outro mecanismo de infra regulação é mediado pelo hormônio inibina secretado pelas células de Sertoli. A inibina é uma glicoproteína que possui duas formas bioativas principais: a inibina A, que consiste em uma subunidade α e uma subunidade βA , e a inibina B que consiste também de uma subunidade α e uma subunidade βB . Nos homens a inibina B é a principal forma de inibição bioativa circulante (ANDERSSON, 1998; MAKANJI et al., 2014).

Acredita-se que a produção de inibina pelas células de Sertoli seja estimulada pelo FSH que age nos seus receptores e, conseqüentemente, estimula o aumento da secreção de inibina que por sua vez, fornece o sinal de infra regulação sobre a secreção de FSH na hipófise (O'CONNOR; DE KRETZER, 2004). Embora elegante em seu design simples, desarranjos em qualquer um desses passos podem ter um tremendo impacto na fertilidade masculina (CLAVIJO; HSIAO, 2018).

A representação esquemática do eixo HHT contendo os hormônios e genes envolvidos na regulação da espermatogênese e fertilidade é ilustrado na Figura 1.

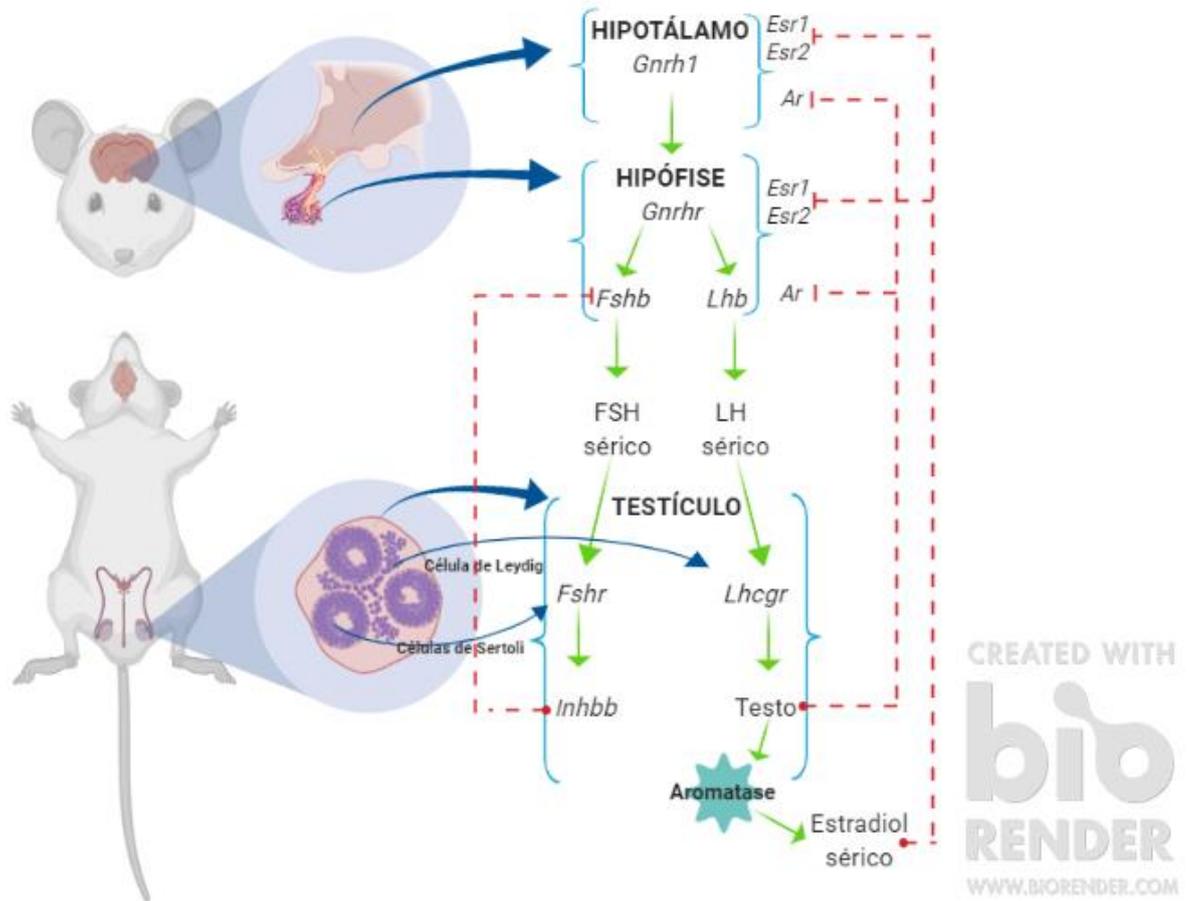


Figura 1- Representação esquemática do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular contendo os hormônios e genes envolvidos na regulação da espermatogênese e fertilidade. Os efeitos estimulatórios estão representados por setas verdes e o mecanismo de infra regulação, representado por linhas tracejadas em vermelho. *Gnrh1*, hormônio liberador de gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; *Gnrhr*, receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas; *Esr1*, receptor de estradiol alpha; *Esr2*, receptor de estradiol beta; *Ar*, receptor de andrógeno; *Fshr*, receptor de hormônio folículo estimulante; *Lhcgr*, receptor de hormônio luteinizante. Imagem criada com aplicativo Bio Render. Fonte: <https://biorender.com/>

2.2 Desenvolvimento e Puberdade

A ontogenia de ratos machos pode ser dividida por diferentes estágios de desenvolvimento, sendo eles o pré-natal, que compreende os dias de gestação (GD 0-21) e a fase do pós-natal, que é a primeira semana de vida extrauterina (onde o dia do nascimento é designado dia 0 pós-natal ou PND 0), um período infantil que se estende de PND 8-21, um

período juvenil que termina em torno de PDN 35 e um período peripuberal que termina em 55-60 dias de idade com o aparecimento de espermatozoides maduros no ducto deferente. Esses estágios de desenvolvimento são similares com o que ocorre em humanos, isso pode ser mostrado na tabela 1 (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018; PREVOT, 2014; STUMP et al., 2014).

Tabela 1- Comparação dos estágios de desenvolvimento em ratos e humanos.

Estágio de Desenvolvimento	Ratos	Humanos
Pré-natal	GD 0-21	GW 0-40
Neonatal	PND 0-7	0-28 dias
Quiescência	Ausente	1 mês a 11 anos
Infantil	PND 8-20	1-23 meses
Juvenil/pré-púberdade	PND 21-32	2-12 anos
Peripuberal	PND 33-55/60	12-16 anos
Adulto	PND >60	17- 21 anos

Fonte: Creasy, Chapin (2017); Picut, Parker (2017); Picut, Remick (2017); Picu, Ziejewski, Stanislaus (2018).

Em humanos a sequência de eventos para a maturação testicular ocorre igualmente ao desenvolvimento nos ratos, porém, em um ritmo diferente e com uma exceção. No homem há um período de quiescência testicular ou um “período silencioso” em que há uma interrupção sustentada na secreção de gonadotrofinas (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018).

Diferenças sexuais marcantes são encontradas na regulação de gonadotrofinas durante as complexas alterações morfológicas que ocorrem do nascimento até a puberdade em ratos. Durante todo o período de desenvolvimento, os ratos exibem flutuações nos níveis séricos de hormônios e genes que influenciam diretamente o sistema reprodutivo. Essas alterações ontogênicas podem estar ligadas a eventos que ocorrem tanto nos níveis neurais quanto nos níveis gonadais (BECÚ-VILLALOBOS et al., 1997).

A puberdade é um importante estágio do desenvolvimento que envolve um amplo espectro de mudanças celulares e físicas. Normalmente esta fase é iniciada pela maturação do eixo HHT que se dá pelo aumento de gonadotrofinas e hormônios esteroides sexuais (ALOTAIBI, 2019). Essa relação pode ser encontrada no Quadro 1.

Quadro 1- Ontogenia dos receptores e hormônios envolvidos na regulação do eixo HHT.

Hormônio/gene	GD 0-21	PND 0-7	PND 8-20	PND 21-32	PND 33-60	PND >60	Referência
<i>Gnrh1</i>	+ (5)	+	++	++	+++	+++	11
<i>Gnrhr</i> receptor	+ (5)	++	++	+++	PND 30-35 +++ PND 40-60 ++	+	1,16
LH	+ (2)	++	++	+++	PND 35-40 ++ PND 40-60 +	+	1,3,6
<i>Lhcgr</i> receptor	+ (7)	+	++	++	+++	+++	8
FSH	+ (2)	+	+	+++	++	++	1, 3, 4
<i>Fshr</i> receptor	+ (7)	+	+	+	PND 40-50 ++ PND 50-60 +++	+++	8
Inibina	+ (9)	+	+	++	+++	+++	10
<i>Ar</i> <i>Testículo</i>		+++	+	+	+	+	13
Testosterona sérica	++	+	+	++	PND 33-50 ++ PND 50-60 +++	+++	1, 6
Estradiol Sérico		+++	+++	++	+	+	15,17
<i>Esr1</i>		++	+++	+++	++	++	12
<i>Esr2</i>		+	+	+++	++	+	12
Aromatase		+	+++	PND 30 +	+		14

Nota: Em destaque as fases de pré-puberdade e puberdade; + = níveis baixos, ++ = níveis moderados, +++ = níveis altos. Espaços em branco representam níveis indeterminados. (1) Chan et al. (1981); (2) Chowdhury; Steinberger (1975); (3) Döhler; Wuttke (1975); (4) Prevot (2014); (5) Dubois (1985); (6) O'Shaughnessy (2014); (7) Warren et al. (1984); (8) Ketelslegers et al. (1978); (9) Hikono; Watanabe (1997); (10) Buzzard et al. (2004); (11) Payne et al. (1976); (12) Tena-Sempere et al. (2001); (13) Yu et al. (2014); (14) Bois et al. (2010); (15) Bell (2018); (16) Janjic; Stojilkovic; Bjelobaba (2017); (17) Caceres et al. (2019).

Grande parte dos receptores e dos hormônios gonadotróficos do eixo HHT alcançam níveis adultos por volta do PND 26 a 35, porém, os níveis séricos de andrógeno, prolactina, inibina B e, mais importante, a pulsatilidade do *Gnrhl* ainda sofrem alterações importantes para desencadear o início da puberdade. Mesmo após o início da puberdade ainda há uma espécie de ajuste fino do eixo HHT até a maturação sexual no PND 56 (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018; STOKER et al., 2000).

O *Gnrhl* aparece no início da formação do cérebro fetal, o gerador de pulsos de *Gnrhl* é ativado no feto logo após a conclusão da migração do neurônio *Gnrhl* para o hipotálamo desempenhando um papel importante na embriogênese. Este está presente no hipotálamo por volta do GD 12. (DUBOIS, 1985; KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018; NEMESK; DETTA; CLAYTON, 1986). A liberação de neurohormônio na circulação porta hipofisária ocorre durante os últimos 2 ou 3 dias de vida fetal, e a ativação hormonal durante esse tempo é essencial para o desenvolvimento do trato reprodutivo e consequente fertilidade na vida adulta (PREVOT, 2014; STOKER et al., 2000). Em ratos machos, o conteúdo de *Gnrhl* hipotalâmico aumenta constantemente durante período neonatal e é secretado de forma pulsátil do PND 5 até a puberdade quando atinge um pico de concentração por volta do PND 40 (DUBOIS, 1985; PAYNE et al., 1976; PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018; PREVOT, 2014).

Os receptores de *Gnrhl* podem ser detectados na hipófise aos 17 dias de gestação (DUBOIS, 1985), a concentração de receptores de *Gnrhl* aumenta progressivamente até os 35 dias de idade e é seguida por um declínio gradual na concentração entre o PND 60 e 80, quando os animais atingem a maturidade sexual. Isso pode ser explicado pelo aumento da testosterona sérica que exerce efeitos de infra regulação sobre os receptores. A concentração de receptores de *Gnrhl* hipofisário atinge pico máximo no período pré-puberal ao mesmo tempo em que os níveis séricos de gonadotrofinas também se encontram em grandes concentrações (CHAN et al., 1981).

A primeira secreção de LH é ativamente impulsionada pelo *Gnrhl* e ocorre por volta do GD 17 no rato (DUBOIS, 1985). Durante o período pós natal as concentrações aumentam acentuadamente e logo antes do início da puberdade, os níveis de FSH aumentam (PND 30-40), e esse surto de FSH ocorre coincidentemente com a maturação da pulsatilidade dos neurônios liberadores de *Gnrhl* (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018) (CHAN et al., 1981; DÖHLER; WUTTKE, 1975), depois decaem quando as concentrações séricas de testosterona atingem níveis semelhantes aos observados em ratos adultos (PREVOT, 2014). Por volta do dia 15 de gestação é possível identificar os receptores de LH. Já na fase pós-natal

esses receptores começam a aumentar de forma contínua até a puberdade coincidindo com o aumento de testosterona plasmática (KETELSLEGERS et al., 1978; WARREN et al., 1984).

O FSH pode ser detectado somente depois do GD 16, sendo que é observado um pequeno aumento durante o período neonatal até o PND 5, quando caem drasticamente. O nível máximo atingido ocorre na fase da pré-puberdade e por volta do PND 30 as concentrações começam a decair (CHAN et al., 1981; CHOWDHURY; STEINBERGER, 1975; DÖHLER; WUTTKE, 1975; DUBOIS, 1985; PREVOT, 2014). Os receptores de FSH são detectáveis nos testículos por volta do GD 17. Após o nascimento o número total de receptores por testículo aumenta gradualmente de 2-28 dias, permanecendo constante até o dia 25 e, em seguida, aumenta até o PND 60 (KETELSLEGERS et al., 1978; O'SHAUGHNESSY; DUDLEY; RAJAPAKSHA, 1996; RANNIKKI; ZHANG; HUHTANIEMI, 1995).

A testosterona pode ser encontrada por volta do GD17 e após o nascimento até PND19. Esta se encontra em níveis baixos e diminui ligeiramente entre PND20 e PND 30 antes de aumentar drasticamente entre PND 40 e PND 60 para concentrações significativamente mais altas do que nas adultas (BELL, 2018). A testosterona exerce efeitos de infra regulação no eixo hipotalâmico-hipofisário ao longo da vida, mesmo durante o período neonatal (CHAN et al., 1981; HOSPITAL; FLOREY, 1974; PREVOT, 2014; WEISZ; WARD, 1980).

Os espermatozoides na junção da cauda epidídimo-vaso deferente são observados em torno dos 55 dias de idade em ratos. Esse evento ocorre concomitantemente com um aumento acentuado nos níveis de testosterona que cujo padrão de secreção é altamente correlacionado com o padrão de secreção de LH. É importante ressaltar que são necessários 40 a 54 dias para completar o início da espermatogênese, período de tempo que corresponde exatamente a idade da puberdade em ratos (PREVOT, 2014).

O alto número de células de Leydig fetal no início do período neonatal é responsável por níveis relativamente altos de testosterona sérica ao nascimento. À medida que o estágio neural progride e as células fetais de Leydig regridem e em vez de produzir testosterona, as células progenitoras de Leydig produzem predominantemente 5α -androstano- 3α , 17β -estradiol. Em consequência disso, há uma queda nos níveis de testosterona (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018; STUMP et al., 2014).

A inibina imunorreativa é detectada no testículo de ratos a partir do dia do GD 16 e permanece sem alterações significativas até O PND 25, onde o conteúdo testicular total da inibina aumenta progressivamente em conjunto com os níveis de FSH atingindo um platô aos

50 dias de idade (BUZZARD et al., 2004; HIKONO; WATANABE, 1997). Vários estudos apontam a presença da inibina B nas células intersticiais testiculares, tanto no período pré-natal quanto no pós-natal no rato, porém os resultados não são consistentes entre os diferentes relatórios. Em um estudo Majdic et al., (1997), utilizando anticorpos monoclonais altamente específicos, demonstraram imunocoloração intensa para ambas as subunidades de inibina nas células intersticiais dentro do testículo fetal de rato. Porém, estudos realizados com camundongos demonstram que a Inibina B não é essencial para o desenvolvimento do testículo durante a vida fetal.

O início da expressão dos receptores de andrógenos (*Ar*) gira em torno do início da expressão da testosterona. É possível identificar os receptores no hipotálamo e na hipófise por volta do GD 14. O *Ar* nesse estágio de desenvolvimento fornece meios para facilitar a ação da testosterona na diferenciação do ducto de Wolff (VITO; FOX, 1981; YOU; SAR, 1998; YOUNG; CHANG, 1998).

Em relação a expressão dos receptores de estrógeno localizados no cérebro de ratos o *Esr1* apresenta valores baixos no primeiro dia de vida, porém, durante o desenvolvimento pós-natal, esses valores aumentam permanecendo constantes. Já o *Esr2* também se apresenta em níveis baixos no nascimento, aumentando acentuadamente entre o PND 15 e PND 30 e diminuindo após o PND 45 (TENA-SEMPERE et al., 2001).

A maturação do eixo pode ser dividida em três etapas. A primeira compreende a formação de seus componentes, que geralmente ocorre antes do nascimento em todas as espécies. O segundo é a masculinização do cérebro induzida pelas gônadas durante o qual o hipotálamo é programado para se transformar no eixo HHT com pulsatilidade. E por fim o terceiro é a verdadeira maturação bioquímica/fenotípica da rede neuro-gliar do hipotálamo, pouco antes da puberdade. Deste modo, mesmo que os neurônios *Gnrh1* estejam presentes ao nascimento e sejam capazes de produzir hormônio liberador, e os testículos tenham receptores para responder a esses estímulos, o eixo não é funcional até o seu amadurecimento que ocorre no início da puberdade (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018).

O período peripuberal abrange os estágios entre o início da puberdade e a maturidade sexual. O início da puberdade ocorre quando os espermatozoides maduros são vistos pela primeira vez nos túbulos seminíferos (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018). O estágio puberal é um período importante de desenvolvimento, pois este é responsável pelas profundas mudanças biológicas, morfológicas e celulares necessárias para a reprodução sexual na fase adulta (ADEDARA et al., 2018), e devido a esse fato, essa fase do desenvolvimento se torna uma janela potencialmente suscetível a exposições químicas. A desregulação de todo esse

sistema pode resultar em aumento do risco de doença na vida adulta (KASPER-SONNENBERG et al., 2017).

O início da puberdade pode ser caracterizado como um processo de maturação do eixo HHG, período de transição entre o estado juvenil e adulto, levando ao desenvolvimento de características sexuais secundárias e a fertilidade (CACERES et al., 2015; GOLDMAN et al., 2000). A puberdade e a regulação da fertilidade são governadas por uma complexa rede neural, principalmente pelo hipotálamo, que consiste nos neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (*Gnrh1*) que é o principal regulador da secreção de gonadotrofinas e do crescimento e função gonadal pós-natal (PREVOT, 2014). A puberdade então é dependente da ativação do eixo HHG, que resulta na secreção do *Gnrh1*, este por sua vez, estimula a secreção de LH e FSH pela hipófise resultando na maturação da gametogênese, bem como a secreção de hormônios gonadais (LANCIOTTI et al., 2018).

O desenvolvimento adequado dos neurônios, expressão e sinalização de *Gnrh1* é essencial para a maturação sexual e o funcionamento normal do eixo HHG em mamíferos (PREVOT, 2014) É notável que embora o período crítico de diferenciação sexual inclua estágios fetais e pós natais precoces, a manifestação de algumas patologias e disfunções podem ocorrer mais tardiamente na vida, começando pela puberdade (RULLI; CAMBIASSO; RATNER, 2018). Considera-se que o tempo puberal é resultado da integração entre fatores genéticos, endócrinos e ambientais. Alguns compostos que estão presentes na dieta e no meio ambiente podem desempenhar um papel no início da puberdade, pois, podem perturbar o sistema endócrino. Dentre esses compostos que apresentam essa característica estão as isoflavonas (SEGOVIA-SIAPCO et al., 2017).

2.3 Isoflavonas

As isoflavonas pertencem a classe de fitoestrogenos, um grupo de 2 compostos vegetais com estrutura não esteroideal encontrados quase que exclusivamente em leguminosas. A principal ingestão dietética de isoflavonas é através de produtos contendo soja ou suplementos alimentares a base de soja (BEEKMANN et al., 2015; DUITAMA et al., 2018). Outras fontes alimentares de isoflavonas incluem outras leguminosas, o grão de bico, feijão, linhaça e alfafa (KŘÍŽOVÁ et al., 2019).

Na estrutura química das isoflavonas está presente um anel aromático monossubstituído por um grupo hidroxila. As isoflavonas podem ser encontradas nas formas de glicosídeos, que são biologicamente inativos e ligados a uma unidade de açúcar, e de

agliconas que são formas livres biologicamente ativas (DUITAMA et al., 2018; SINGLA et al., 2019). Os principais tipos de isoflavonas encontradas na soja são a genisteína, daidzeína e em menor quantidade a gliciteína. Estas se encontram na forma conjugada, ligadas a vários açúcares, resultando em uma composição complexa e diferente entre os alimentos. As formas conjugadas não cruzam o enterócito e sendo assim, não são biodisponíveis ou bioativas. A hidrólise pelas enzimas glicosidases intestinais é essencial para liberar os aglicóis bioativos dos açúcares para propiciar a absorção e atividade biológica (CHEN; LIN; HU, 2003; SETCHELL, 2017; ZHANG; ZUO; LIN, 2007).

A quantidade de isoflavonas presente na soja, por exemplo, depende principalmente das condições de cultivo. As concentrações dos diferentes tipos de isoflavonas podem aumentar acentuadamente durante o período de estresse como em condições de baixa humidade e ataque de patógenos ou doença de plantas, ou ainda, por condições ambientais e climáticas como temperatura, precipitação, período de colheita ou fertilidade do solo (KŘÍŽOVÁ et al., 2019).

O processamento dos alimentos à base de soja também pode interferir de modo significativo no teor de isoflavonas encontrado na composição. Em geral, os alimentos feitos de proteína de soja purificadas podem conter aproximadamente 1,0 a 1,5 mg de isoflavonas/g de proteína, enquanto maiores ingestões de isoflavonas podem ser alcançadas através do consumo de alimentos integrais de soja. Essa diferença de composição pode ser capaz de explicar a divergência entre os efeitos clínicos observados entre os estudos de intervenção dietética de alimentos à base de soja e isoflavonas (SETCHELL, 2017).

Um estudo de Lee et al., (2019), mostrou que muitas leguminosas, principalmente a soja, contém quantidades significativas de isoflavonas, e estas foram encontradas como ingredientes em vários alimentos processados como, produtos a base de carne e peixe, com uma finalidade econômica, nutricional ou tecnológica. Mostrou ainda que alimentos como hambúrgueres, almôndegas, kebabs e pizzas podem conter quantidades significativas de isoflavonas e que uma ingestão maior que 45 mg/dia de isoflavonas está significativamente associada a uma dieta vegetariana.

O número de pessoas que adotam um estilo de vida vegetariano aumenta constantemente. Nos Estados Unidos 3,3% da população é vegetariana, já na Europa esse número chega a 5% (BETTINELLI et al., 2019). Um estudo em duas escolas alemãs demonstrou que 34% dos jovens tinham uma dieta vegetariana sendo que 1,5% tinham idades entre 6 e 11 anos, e 5,1% idades entre 12 e 17 anos (PATELAKIS et al., 2019). Diante desses

fatos é notável que há um número crescente de jovens em idade de pré-puberdade que consomem vários alimentos que são fonte de isoflavonas.

As isoflavonas podem ser consideradas desreguladores endócrinos com possíveis influências negativas sobre o estado de saúde em uma determinada parte da população. Estas são capazes de se ligar a receptores estrogênicos e exercer efeitos semelhantes ao estrogênio, e são, portanto, classificados como fitoestrógenos (KŘÍŽOVÁ et al., 2019; VAN DIE et al., 2014). Uma das possíveis razões subjacentes a este modo de ação das isoflavonas pode estar relacionada com seus efeitos nos dois receptores de estrogênio funcionalmente diferentes sendo eles o *Esr1* e *Esr2*. Portanto, estas podem exercer efeitos tanto estrogênicos quanto antiestrogênicos através das suas interações com ambos os receptores. Isso ocorre devido à sua semelhança estrutural ao 17β -estradiol (Figura 2). (BEEKMANN et al., 2015).

A interação entre isoflavonas e receptores estrogênicos nucleares que ativam os elementos de resposta do estrogênio é denominada via de sinalização genômica. As isoflavonas exercem uma miríade de efeitos em diferentes sistemas e órgãos do corpo. Podem afetar o sistema imunológico, sistema reprodutivo, sistema nervoso, ossos entre outros (GAFFER et al., 2018).

A genisteína possui uma afinidade maior pelo *Esr2* do que pelo *Esr1*, mas a afinidade aos *Ers* em geral é menor do que a do estradiol. Nesse contexto, as isoflavonas podem apresentar um comportamento estrogênico e antiestrogênico, de acordo com o nível de estradiol endógeno e o número e tipo de *Ers* (XIAO et al., 2018). Diferentes ações são desencadeadas pela ligação dependendo do tipo de *Ers*, o *Esr2* ativa o complexo transcricional, promovendo a transcrição do *Gnrh1*, enquanto que a ativação do *Esr1* está envolvida na supressão da síntese e liberação do *Gnrh1* (CAVALLIN et al., 2018).

Akingbemi et al. (2007) demonstraram que em ratos machos expostos a genisteína durante o período perinatal, há a diminuição a função das células de Leydig, afetando assim a secreção de testosterona resultando em alterações no sistema reprodutor masculino e, além disso, a exposição crônica a doses baixas (1 mg/kg^{-1}) ou doses altas (10 mg/kg^{-1}) de genisteína pode exercer efeitos deletérios sobre o desenvolvimento do sistema reprodutivo e fertilidade (CACERES et al., 2015).

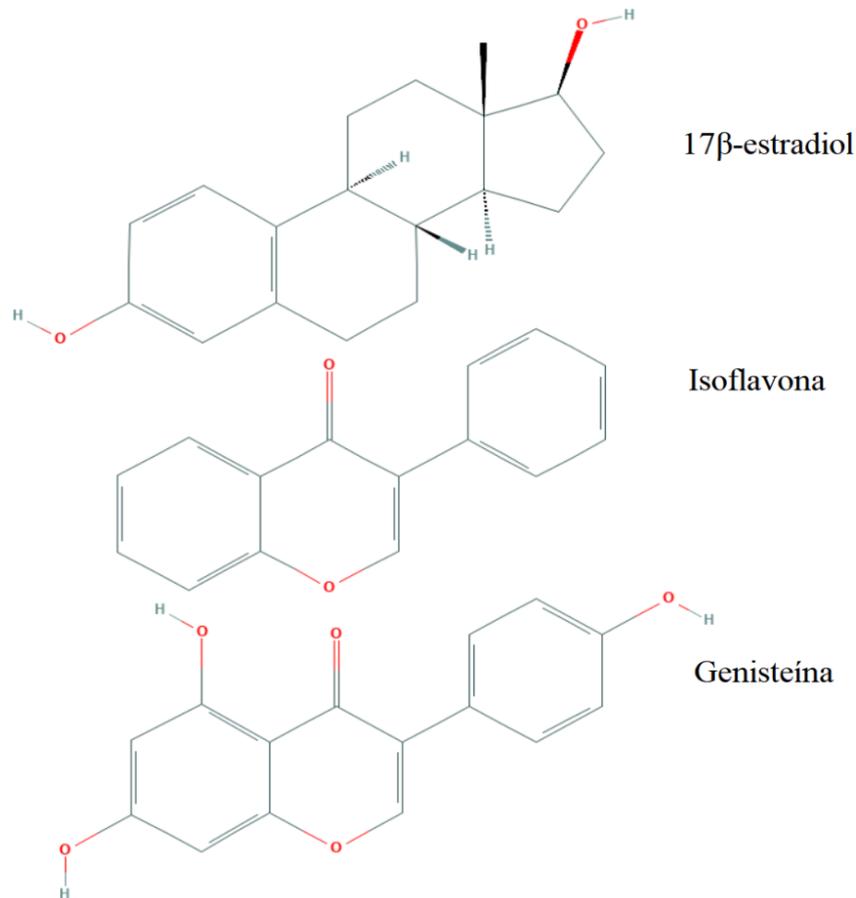


Figura 2- Comparação entre as estruturas químicas do 17β-estradiol, das isoflavonas e genisteína isolada. Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Isoflavone, CID=72304, Estradiol, CID=5757, Genistein, CID=5280961, (accessed on May 8, 2019).

2.4 Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos (EDCs) podem ser definidos como “agentes exógenos que interferem tanto na produção quanto na liberação, transporte, metabolismo, ligação, ações ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pela manutenção da homeostase e pela regulação dos processos de desenvolvimento” (KAVLOCK et al., 1996).

O termo EDCs tem sido utilizado para descrever uma série de substâncias, incluindo produtos químicos fabricados e compostos naturais que podem atrapalhar a ação de hormônios endógenos (COMBARNOUS; NGUYEN, 2019; ELANGO VAN et al., 2019; LYMPERI; GIWERCMAN, 2018). Devido à grande quantidade de bens de consumo e produtos de cuidados pessoais contendo EDCs, os seres humanos estão expostos aos efeitos prejudiciais dessas substâncias de várias formas como a ingestão, pela poeira e água, através

da inalação de gases e partículas no ar, e através da pele (DZIEWIRSKA; HANKE; JUREWICZ, 2018; KNEZ, 2013).

De acordo com a via de exposição os EDCs podem entrar na cadeia alimentar e se acumular nos tecidos de animais e humanos. A maioria desses compostos parece ser altamente lipofílico, acumulando-se portanto no tecido adiposo, e essa característica pode explicar a razão pela qual os EDCs são capazes de se acumular durante anos no tecido, fazendo com que a co-contaminação seja frequente (LAURETTA et al., 2019).

Entre essas substâncias podem ser citadas a acrilamida, presente em alimentos (MATOSO et al., 2019), nanopartículas de prata, presente no revestimento de equipamentos cirúrgicos, próteses, cateteres e curativos, e produtos de consumo, como creme dental, spray, cosméticos, embalagens de alimentos, entre outros (CAVALLIN et al., 2018; LOPES et al., 2019; SLEIMAN et al., 2013), bisfenol A, presente em plásticos e plastificantes (CAMPOS et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2017) e herbicidas a base de glifosato (DE SOUZA et al., 2017; ROMANO et al., 2011).

Baseados em estudos epidemiológicos e experimentos em laboratórios há muito tempo suspeita-se que esses compostos interferem no sistema reprodutivo, devido às tendências descendentes e temporais na qualidade do sêmen e nos níveis de testosterona entre os homens adultos. Pesquisas relatam cada vez mais preocupação com o risco potencial dos EDCs à saúde reprodutiva masculina (DZIEWIRSKA; HANKE; JUREWICZ, 2018).

Os EDCs podem ativar ou inibir a função de alguns receptores hormonais como o *Ers*, *Ars* e receptores de tireoide. Estes também podem atuar por meio de receptores não-esteroides, co-ativadores transcricionais, vias enzimáticas ou metabolismos de esteroides entre outros. A maioria dos EDCs possuem maior ação em órgãos como fígado, rim, glândula tireoide e os testículos, tendo efeitos mais marcantes em homens devido a grande maioria dessas substâncias possuírem atividade antiandrogênica ou função estrogênica (LYMPERI; GIWERCMAN, 2018).

Os EDCs podem ter vários mecanismos de ação podendo imitar os efeitos dos hormônios naturais, agindo como um ligante em seus sítios específicos, antagonizando o efeito desses hormônios bloqueando sua interação com seus sítios de ligação fisiológica, reagindo de forma direta ou indiretamente com o hormônio em questão, alterando o padrão natural de síntese/degradação dos hormônios e ainda causar alteração dos níveis de receptores hormonais celulares (PATISAUL, 2017).

Os EDCs exercem efeito não tradicionais a dose, não apresentam um padrão toxicológico clássico, devido às diferentes ações que esses podem exercer sobre os receptores

hormonais. Nesse sentido, doses menores podem induzir um efeito tóxico mais significativo do que em doses mais altas, dificultando assim a determinação de parâmetros como o LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) e o NOAEL (No Observed Adverse Effect Level).

Além disso, a complexidade dos efeitos inclui o conceito de “janelas de vulnerabilidade”. Evidências mostram que a fase do desenvolvimento em que ocorre a exposição a esses agentes é de importância primordial na avaliação dos efeitos sobre o sistema endócrino, sendo que o período embrionário e a pré-puberdade estão entre os períodos mais suscetíveis a uma desregulação endócrina (LAURETTA et al., 2019; MATOSO et al., 2019).

Estudos recentes apontam que a exposição aos EDCs durante o desenvolvimento pode não apenas causar dano direto ao indivíduo exposto, mas também as gerações futuras (processo chamado de herança transgeracional) (JAZWIEC; SLOBODA, 2019; LAURETTA et al., 2019; RATTAN; FLAWS, 2019). Os desequilíbrios hormonais ocorridos nesses períodos podem levar a distúrbios hormonais em adultos apoiando o conceito da Origem do Desenvolvimento da Saúde e Doença (DOHaD) (MATOSO et al., 2019). O organismo em desenvolvimento possui plasticidade, sendo assim, a regulação da expressão gênica e das vias de sinalização celular são sensíveis e, portanto, adaptadas a estímulos ambientais. Tem sido cada vez mais proposto que essas adaptações podem afetar negativamente a saúde e resultar em aumento do risco de doença (JAZWIEC; SLOBODA, 2019).

Esse conceito propõe que o ambiente em que um indivíduo é exposto durante o seu desenvolvimento, pode afetar a sua sensibilidade ou risco de desenvolver doenças mais tardiamente. Durante o desenvolvimento, as interações entre o genoma, o epigenoma e os fatores estocásticos e ambientais, contribuem na formação de sistemas de órgãos funcionais em um estado adulto desenvolvido com tecidos estavelmente diferenciados (HO et al., 2017).

O princípio de que o ambiente nutricional, hormonal e metabólico proporcionado pela mãe pode programar permanentemente a estrutura e fisiologia de sua prole foi estabelecido há muito tempo. A teoria do DOHaD avança agora estendendo as janelas críticas de desenvolvimento incluindo a fase pré-concepcional, perinatal, neonatal, pós-natal e puberal (HO et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral e Hipótese central

3.1.1 Objetivo geral

Investigar as ações da isoflavonas e genisteína isolada sobre a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular em ratos Wistar machos expostos a essas substâncias durante o período pré-púbere.

3.1.2 Hipótese central

A exposição à fitoestrógenos, isoflavonas e genisteína isolada, em idade pré-púbere pode alterar a função hormonal e a expressão de genes relacionados ao eixo hipotalâmico hipofisário testicular, prejudicando assim a fertilidade em ratos machos adultos e modulação do eixo de maneira prejudicial.

3.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos desreguladores endócrinos causados pela exposição pré-púbere a isoflavonas e genisteína isolada:

- Crescimento corporal e puberdade;
- Na expressão hipotalâmica dos transcritos de *Gnrh1*, *Esr1*, *Esr2* e *Ar*;
- Expressão hipofisária dos transcritos de *Gnrhr*, *Lhb*, *Fshb*, *Esr1*, *Esr2* e *Ar*;
- Expressão testicular dos transcritos de *Lhcgr*, *Fshr*, *Inbb* e aromatase;
- Na avaliação das concentrações séricas de LH, FSH, testosterona e estradiol;

4. METODOLOGIA

4.1 Manejo dos animais

Para a experimentação, foram utilizados ratos Wistar machos provindos do Biotério da PUC -Pontifícia Católica do Paraná. Estes foram subdivididos em grupos de 4 animais e acomodados em caixas de propileno (43 x 43 x 20 cm) contendo uma camada de 5 cm de maravalha. Os animais foram mantidos em uma sala com instalações adequadas, com fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro, temperatura controlada de 23 ± 1 °C e mantidos com ração comercial livre de soja (PragSoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil) e água *ad libitum*. A dieta sem soja foi formulada com: matéria mineral (máx) 6,2 %, proteína bruta (min) 14 %, extrato etéreo 4 %, fibra bruta 4,2 % e carboidratos 71,7 %; e com os componentes: milho, farelo de trigo, albumina, óleo de milho, óleo do canola, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, carbonato de cálcio, premix de minerais, vitaminas e aminoácidos. Todos os procedimentos estão de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal já aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Centro-Oeste (005/2017 CEUA/UNICENTRO, em anexo).

4.2 Delineamento experimental

Os 42 ratos foram divididos em seis grupos contendo 7 animais cada. Três grupos foram expostos as diferentes concentrações de isoflavonas (0,5; 5 ou 50 mg/kg), dois grupos foram tratados com diferentes concentrações de genisteína (0,5 e 5 mg/kg) e um grupo controle recebeu somente óleo de milho. A administração das soluções se deu do 23º dia de idade dos ratos (PND23) aos 60 dias de idade (PND60). A administração foi realizada por via oral (gavagem) uma vez ao dia, sempre pela manhã e com o volume de 0,25 mL/100g de peso corporal, utilizando-se óleo de milho para a diluição. O período e protocolo experimental foi baseado no protocolo sugerido por Stoker (2000) à EDSTAC (Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee) que compreende a avaliação de efeitos dos desreguladores endócrinos no período pré-púbere e puberdade.

Aos 60 dias de idade, os animais foram submetidos a eutanásia por sobrecarga anestésica, através da administração de 60 mg/kg de quetamina, 10 mg/kg de xilazina e 3 mg/kg de acepromazina por via intraperitoneal. Logo em seguida, os tecidos foram colhidos para realização das análises seguintes.

4.3 Colheita de tecidos

4.3.1 Sangue

Após o protocolo anestésico, o sangue foi coletado através de punção cardíaca sendo as amostras depositadas em tubos a vácuo. O sangue foi centrifugado a 3.500 rpm (Excelsa II 206 BL, São Paulo, SP, Brasil) por 15 min para a obtenção do soro sanguíneo. O soro foi separado e mantido a -80 °C até as subseqüentes análises hormonais de LH, FSH, testosterona e estradiol.

4.3.2 Colheita de tecidos para biologia molecular

Após eutanásia, hipotálamo, hipófise e testículo foram rapidamente excisados, congelados em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C até as subseqüentes análises.

4.4 Identificação das alterações de expressão gênica pela quantificação do mRNA

4.4.1 Homogeneização e extração de RNA total dos tecidos

Os tecidos colhidos (hipotálamo, hipófise e testículo) foram pulverizados em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, em seguida foram transferidos para tubos de coleta e armazenados a -80 °C. A extração do RNA total foi realizada pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio (Chomczynski; Sacchi, 1987) através da utilização do Reagente Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, USA), conforme instruções do fabricante. Para isso, 1ml do reagente Trizol® foi adicionado a uma alíquota de 50mg de cada tecido já pulverizado e homogeneizadas durante 1 minuto com o auxílio de agitador de tubos tipo vortex. Na etapa seguinte as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para outro microtubo e este foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos para que a dissociação de nucleoproteínas ocorresse.

Em seguida a esse processo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras foram novamente homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas novamente nas mesmas condições a anterior. Nesse processo obteve-se a separação das soluções em 3 fases. A fase aquosa de

aparência incolor, contendo o RNA de cada tecido, foi transferida para novos microtubos e em seguida foram adicionados 500 μL de isopropanol para que ocorresse a precipitação do RNA total. As amostras foram novamente homogeneizadas por 10 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas e assim, pode-se observar a formação do sedimento de RNA (*pellet*), o sobrenadante foi descartado e o microtubo foi mantido a temperatura ambiente durante 5 minutos para que o sedimento secasse. Ao final do procedimento de extração, o sedimento foi ressuspensionado em 20 μL de água livre de RNase e estes armazenados em ultrafreezer a -80°C .

A concentração do RNA total foi estimada pela densidade óptica (DO) da solução, mensurando-se a absorbância a 260 nm e o grau de pureza determinado pela razão A260nm/280nm. Após a quantificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em tampão TBE para análise da integridade do RNA e depois armazenadas a -80°C .

4.4.2 Reação de transcrição reversa

Em seguida a extração de RNA, foi utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA), de acordo com as instruções do fabricante, para que o RNA total fosse submetido à reação de transcrição reversa, resultando na síntese de uma fita de DNA complementar à fita de mRNA (cDNA). Para que ocorresse a abertura da fita de RNA, foi adicionado em cada amostra 0,5 μL de oligo dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e as amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos. Na etapa seguinte, adicionou-se 0,5 mM de cada dNTP, 2 μL de GoScript 5X buffer, 0,25 μL de inibidor de RNase (Rnasin), 0,5 μL de enzima (200U/ μl) M-MLV Reverse Transcriptase e água livre de nucleases qsp 10 μL . Para que a reação de transcrição reversa ocorresse, foi utilizado um ciclo de 25°C por 5 minutos e em seguida 42°C por 60 minutos em Termociclador Axygem Maxygene modelo THERM-1000. Como resultado para cada reação obteve-se 10 μL de cDNA com concentração final estimada em 250 ng/ μL . As amostras foram armazenadas a -20°C até subseqüentes análises de PCR em tempo real.

4.4.3 Confeção dos oligonucleotídeos (primers)

Para que a reação de quantificação dos genes por PCR ocorresse foram utilizadas sequências de referência dos transcritos de interesse obtidas no GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As condições de amplificação (concentrações de cDNA e primer) já foram padronizadas previamente em nosso laboratório, buscando-se a eficiência ideal entre 90 e 110 % (Livak and Schmittgen 2001).

A confecção dos oligonucleotídeos foi realizada com o auxílio do recurso Pick Primer disponível no GenBank, de maneira que a amplificação das amostras ocorresse ao menos em uma região de junção entre dois exons distintos, proporcionando assim, uma maior especificidade e a não amplificação de DNA genômico, que não é de interesse para o estudo. Os pares de oligonucleotídeos foram verificados quanto à ligações complementares pelos recursos do OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) e o tamanho dos fragmentos gerados pela reação de PCR em tempo real foi confirmado em eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em TBE, onde o padrão de migração da amostra foi comparado ao padrão de massa molar de 100 pb (100bp DNA Ladder, LifeTechnologies, Carlsbad, USA). No Quadro 1 estão presentes os nomes dos genes, as sequências dos oligonucleotídeos e o número da sequência de referência utilizada no NCBI.

Quadro 2- Oligonucleotídeos *forward* (F) e *reverse* (R) de cada gene utilizados para o ensaio de PCR em tempo real e as respectivas sequências de referência.

Gene	Oligonucleotídeo (5'-3')	Sequência de referência
<i>Ar</i> (Receptor de andrógeno)	F: GCCATGGGTTGGCGGTCCTT R: AGGTGCCTCATCCTCACGCACT	NM_012502.1
<i>Esr1</i> (Receptor de estradiol 1)	F: CCATATCCGGCACATGAGTA R: TGAAGACGATGAGCATCCAG	NM_012689.1
<i>Esr2</i> (Receptor de estradiol 2)	F: CTCACGTCAGGCACATCAGT R: TGTGAGCATTGAGCATCTCC	NM_012754.1
<i>Gnrh1</i> (Hormônio liberador de gonadotrofinas)	F: AGGAGCTCTGGAACGTCTGAT R: AGCGTCAATGTCACACTCGG	NM_012767.2
<i>Gnrhr</i> (Receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas)	F: GCTGCCTGTTTCATCATCCCT R: CTGTAGTTTGCCTGGGTCCT	NM_031038.3
<i>Lhb</i> (Hormônio luteinizante)	F: ATGAGTTCTGCCCAGTCTGC R: GTGGGTGGGCATCAGAAGAG	NM_012858.2

<i>Fshb</i> (Hormônio folículo estimulante)	F: AAGTCGATCCAGCTTTGCAT R: GTCCCAGGCCTCTTACAGTG	NM_0010075 97.1
<i>Lhcgr</i> (Receptor de hormônio luteinizante)	F: AGTGGAGCCTTCCAGGGGGC R: AGGAAGACAGGGCGATGAGCGT	NM_012978.1
<i>Fshr</i> (Receptor de hormônio folículo estimulante)	F: TCACTGGCTGTGTCATTGCTC R: GAGATCTCTATTTTCTCCAGGTCTC	NM_199237.1
<i>Inhbb</i> (Inibina Beta)	F: GAGCGCGTCTCTGAGATCAT R: GAAGAAGTACAGGCGGACCC	NM_080771.1
<i>Rpl19</i> (Proteína ribossomal L19)	F: CAATGAAACCAACGAAATCG R: TCAGGCCATCTTTGATCAGCT	NM_031103.1
<i>Cyp19a1</i> (Aromatase)	F: CGTCATGTTGCTTCTCATCG R: TACCGCAGGCTCTCGTTAAT	NM_017085.2

4.4.4 Reação de quantificação por PCR em tempo real

Após a reação de transcrição reversa e o preparo dos oligonucleotídeos, foi utilizado o método de PCR quantitativo em tempo real para avaliar os níveis de expressão dos genes relacionados ao eixo HHT. Esse método é baseado na detecção de um sinal fluorescente emitido pela reação de amplificação combinada com compostos fluorescentes, onde o aumento do sinal indica a quantidade de DNA que é produzida em cada ciclo de PCR. A quantidade relativa dos genes de interesse foi comparada com os níveis de mRNA do gene constitutivo, a proteína ribossomal L19 (*Rpl19*), de todas as amostras.

O método foi realizado com o uso do kit Platinum SYBR Green PCR Master Mix (LifeTechnologies, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e as condições de amplificação desses genes foram realizadas com auxílio do equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore) utilizando um ciclo de 50°C (2 min), 95°C (2 min), e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60°C (30 s). Ao final da reação, obteve-se uma curva de dissociação com objetivo de confirmar a especificidade da reação. Os valores médios de cycle threshold (Ct) foram automaticamente determinados pelo StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems) e a quantificação foi realizada pelo método de 2- $\Delta\Delta$ Ct, como previamente descrito (Livak & Schmittgen 2001).

4.5 Curva de crescimento, idade e peso a puberdade.

Os animais foram pesados diariamente (DPN23 ao DPN60) para o acompanhamento da evolução do peso corporal durante o experimento e posterior comparação entre os diferentes grupos de tratamento. A verificação da puberdade se iniciou a partir do PND30 e foi determinada pela observação da separação balanoprepucial, onde o descolamento da membrana prepucial e exposição completa da glândula peniana reflete a elevação da testosterona sérica em decorrência da ativação do eixo HHT (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977).

4.6 Dosagens hormonais

O soro previamente separado foi mantido a -80°C para realização das análises hormonais por quimioluminescência. Para o LH e o FSH as dosagens foram realizadas com o auxílio do kit Luminex xMAP technology (Milliplex MAP rat pituitary panel, Billerica, MA, USA), já para a testosterona e estradiol utilizou-se o kit Siemens ADVIA Centaur testosterone test (Siemens, Dublin, Ireland) e kit Siemens ADVIA Centaur enhanced estradiol assay (Siemens, Dublin, Ireland), respectivamente.

4.7 Análise Estatística

As variáveis estudadas foram primeiramente submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Os parâmetros foram avaliados pela ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett. Para a análise do crescimento foi realizada a ANOVA multivariada para medidas repetidas (MANOVA) pelo modelo linear generalizado (GLM). Para a idade à puberdade utilizou-se a análise de Kruskal-Wallis seguida pelo pós-teste de Dunn. Todas as análises foram efetuadas com a utilização do GLM: software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e Graphpad Prism 5.0. Foi considerada diferença estatística quando o valor de p se apresentou inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

Para a determinação e análise das possíveis alterações provocadas aos ratos machos em fase pré-púbere, expostos diariamente a isoflavonas ou genisteína, foram utilizados parâmetros que avaliaram a capacidade reprodutiva, sendo eles: identificação das alterações de expressão gênica pela quantificação do mRNA no hipotálamo, hipófise e testículo, e dosagem do perfil sérico dos hormônios LH, FSH, e testosterona e estradiol envolvidos na função reprodutiva. Os tópicos a seguir apresentam os resultados obtidos.

5.1 Curva de crescimento: idade e peso a puberdade

A avaliação do crescimento corporal teve como objetivo verificar se a exposição pré-púbere às isoflavonas ou genisteína poderia de alguma maneira afetar o desenvolvimento dos ratos. Na Figura 3 está indicada as curvas de crescimento para os ratos dos seis grupos experimentais. Houve influência da idade no crescimento (Wilks, $F=2259$, $p=0,01$) e interação entre idade e tratamentos (Wilks, $F=3,8$, $p=0,01$). Entretanto, quando as mesmas idades são comparadas entre os grupos experimentais não se observou diferença estatística (Tukey HSD, $p>0,05$). Sendo assim, pode-se concluir que as isoflavonas e a genisteína isolada não causam alterações no crescimento dos animais que possam prejudicar o seu desenvolvimento. Esse resultado facilita a interpretação dos parâmetros analisados na sequência, pois delimita as possíveis causas das alterações observadas sobre o eixo HHT.

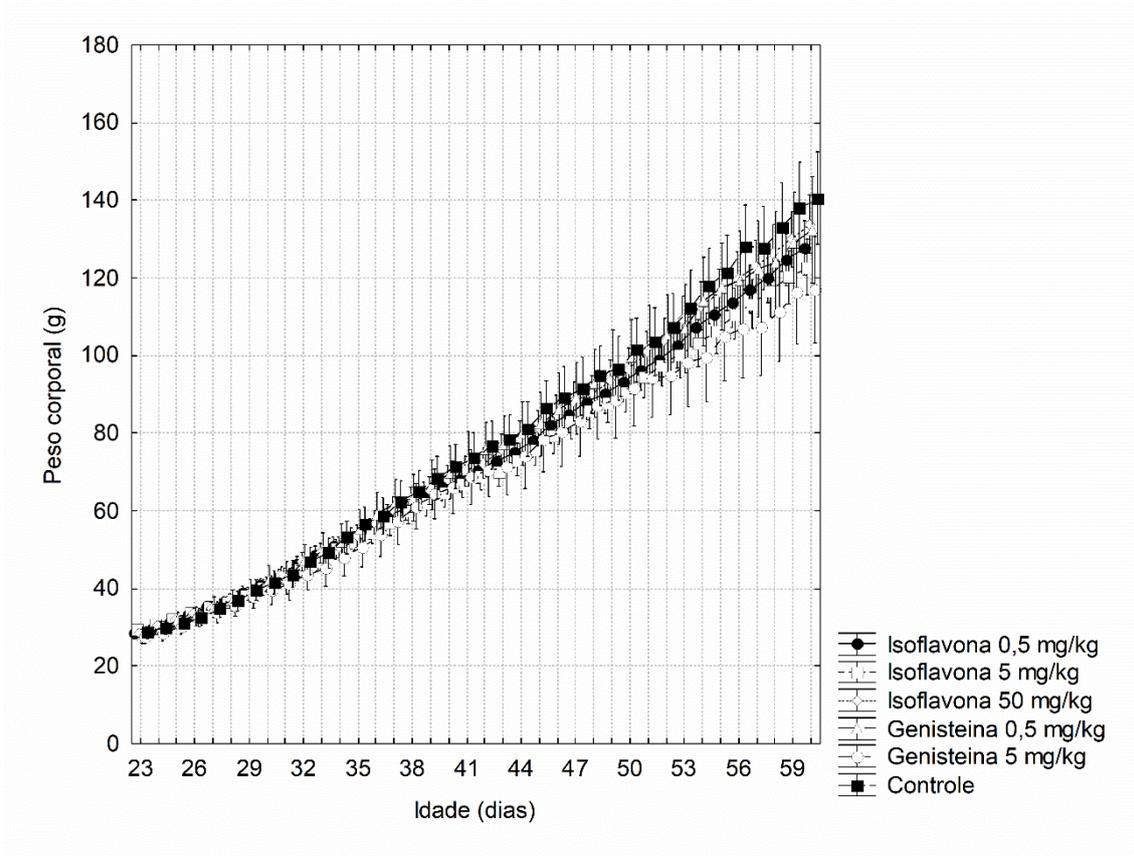


Figura 3- Representação gráfica da evolução do peso corporal de ratos tratados com isoflavonas nas doses de 0,5, 5 ou 50 mg/kg, ou genisteína nas doses de 0,5 ou 5 mg/kg e ratos do grupo controle. A análise foi realizada do PND 23 ao PND 60. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. Análise multivariada de variâncias para medidas repetidas (MANOVA) e pós-teste de Tukey HSD, $n=7$ /grupo. E.P.M.: erro padrão da média.

No momento em que a puberdade foi constatada através do método de separação balanoprepucial, a idade e o peso dos animais foram registrados. Na Figura 4 é possível observar que a exposição a isoflavonas e a genisteína durante o período pré-púbere atrasou a idade à puberdade em ambos os grupos quando comparados ao grupo controle. Já em relação ao peso à puberdade nota-se um aumento deste no grupo tratado em ambas às doses de genisteína.

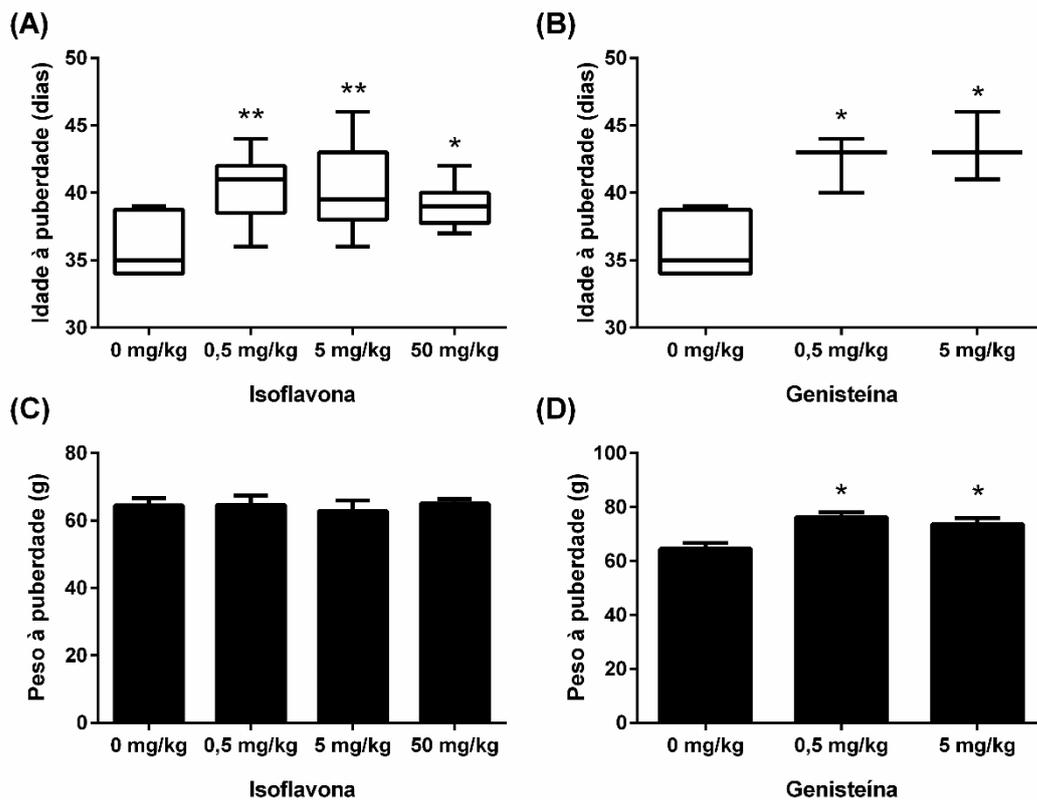


Figura 4- Idade à puberdade (dias) do grupo tratado com isoflavonas (A) e genisteína (B), e peso à puberdade (g) do grupo tratado com isoflavonas (C) e genisteína (D) durante o período pré-púbere. Os dados estão expressos em mediana e intervalo interquartilico para a idade (Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) e média \pm E.P.M. para o peso (ANOVA e pós-teste de Dunnett), $n = 7/\text{grupo}$ * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$

5.2 *Gnrh1* e *Gnrhr*

A secreção dos hormônios gonadotróficos é finamente regulada pelo *Gnrh1* presente no hipotálamo, este controla a expressão diferencial dos genes da subunidade LH e FSH pelos gonadotrofos na hipófise e exerce sua ação através de seu receptor na hipófise (CAVALLIN et al., 2018). Deste modo, foi avaliado a expressão de transcrição (mRNA) do *Gnrh1* no hipotálamo e do *Gnrhr* na hipófise, a fim de averiguar uma possível desregulação causada pela exposição a ISO ou GEN. Não houve alterações significativas nos níveis de expressão do transcrito de *Gnrh1* no hipotálamo, tanto para os grupos tratados com isoflavonas (Figura 5A), quanto para os grupos tratados com genisteína (Figura 5B). Em relação ao transcrito de *Gnrhr* hipofisário, a exposição a isoflavonas na maior dose (Figura 5C) aumentou a expressão deste, já no grupo tratado com genisteína, a exposição a dose de 0.5 mg/kg (Figura 5D) demonstrou uma redução na expressão do transcrito.

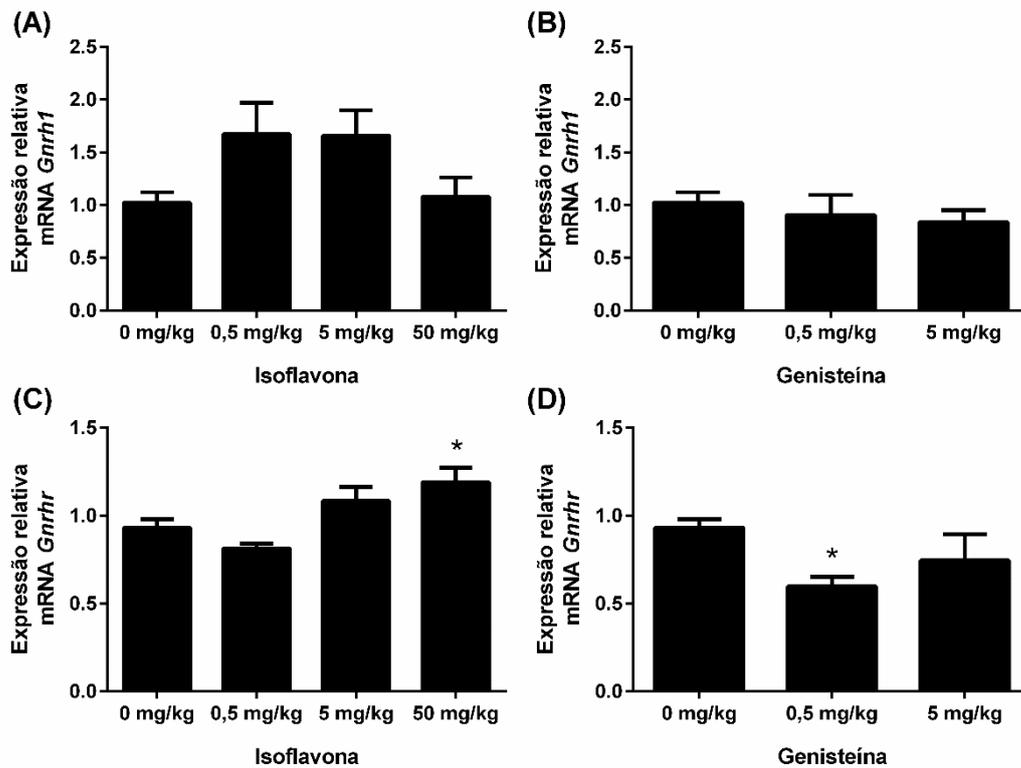


Figura 5- Expressão hipotalâmica dos transcritos de *Gnrh1* (A,B) e expressão hipofisária dos transcritos de *Gnrhr* (C,D) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas, ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett); * $p < 0,05$, $n=7$ /grupo. *Gnrh1*: hormônio liberador de gonadotrofinas; *Gnrhr*: receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas; E.P.M.: erro padrão da média.

5.3 *Lhb*, LH sérico e *Lhcgr*

O LH liberado pela hipófise atinge os testículos e exerce seu efeito através de seus receptores. Sua ação é essencial na regulação da espermatogênese estimulando a produção de testosterona pelas células de Leydig (KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018), nesse contexto foi avaliada a expressão do transcrito de *Lhb* na hipófise, o *Lhcgr* no testículo e adicionalmente a concentração sérica de LH no sangue. A expressão do transcrito de *Lhb* na hipófise (Figura 6A) foi reduzida no grupo tratado com a menor dose de isoflavonas. Já em relação aos grupos tratados com genisteína, não foi possível observar alterações significativas (Figura 6B). O nível de LH sérico aumentou nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg no grupo tratado com isoflavonas (Figura 6C) e não teve alterações relevantes nos grupos tratados com genisteína (Figura 6D). A expressão relativa de *Lhcgr* teve uma resposta aumentada no grupo exposto a

isoflavonas na dose de 50 mg/kg e no grupo tratado com genisteína na dose de 5 mg/kg (Figura 6E e 6F respectivamente).

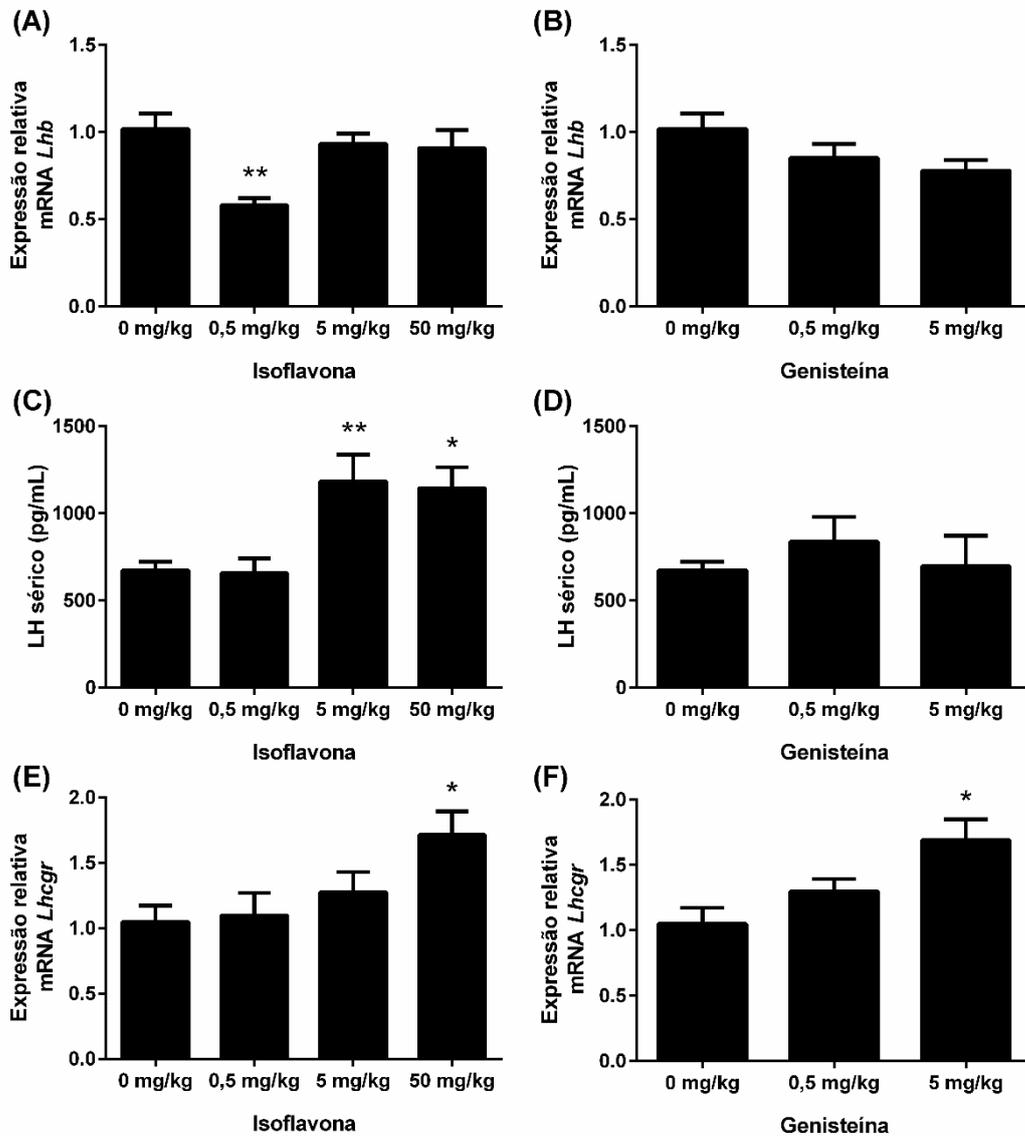


Figura 6- Expressão hipofisária dos transcritos de *Lhb* (A,B), nível de LH sérico (C,D) e expressão testicular dos transcritos de *Lhcgr* (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas, ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett); * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, $n = 7$ /grupo *Lhb/Lh*: hormônio luteinizante; *Lhcgr*: receptor de hormônio luteinizante; E.P.M.: erro padrão da média.

5.4 *Fhsb*, FSH sérico, *Fshr* e *Inhbb*

O FSH estimula a produção de células de Sertoli e juntamente com a testosterona desempenha um papel fundamental na espermatogênese (ODUWOLE; PELTOKETO; HUHTANIEMI, 2018). Sendo assim, a análise teve como objetivo avaliar a função espermatogênica pela expressão dos transcritos *Fhsb* na hipófise e *Fshr* no testículo que estimulam a produção de hormônio e regulam sua ação (supra regulação), a expressão da *Inhbb* nos testículos produzida pelo estímulo do FSH e que tem função inibitória (infra regulação) sobre o *Fhsb* na hipófise, e adicionalmente foi realizada a análise do FSH sérico.

Na avaliação realizada a expressão de *Fhsb* (Figura 7A) não teve alterações significativas no grupo tratado com isoflavonas, apenas é observado uma tendência no grupo de menor dose ($p=0,06$), porém, houve redução na expressão do transcrito para o grupo exposto a genisteína (Figura 7B) na dose de 0,5 mg/kg. O nível de FSH sérico no grupo de menor dose tratado com isoflavonas (Figura 7C) teve um aumento, enquanto não foram observadas alterações para os grupos tratados com genisteína (Figura 7D). O transcrito *Fshr* não teve modificações significativas na sua expressão no grupo exposto a isoflavonas, porém no grupo de maior dose apresenta uma tendência (Figura 5E, $p=0,07$), não foram encontradas alterações para o grupo tratado com genisteína (Figura 7F). Não foi possível observar alterações significativas para a expressão da *Inhbb* em ambos os grupos tratados (Figura 7G e 7H).

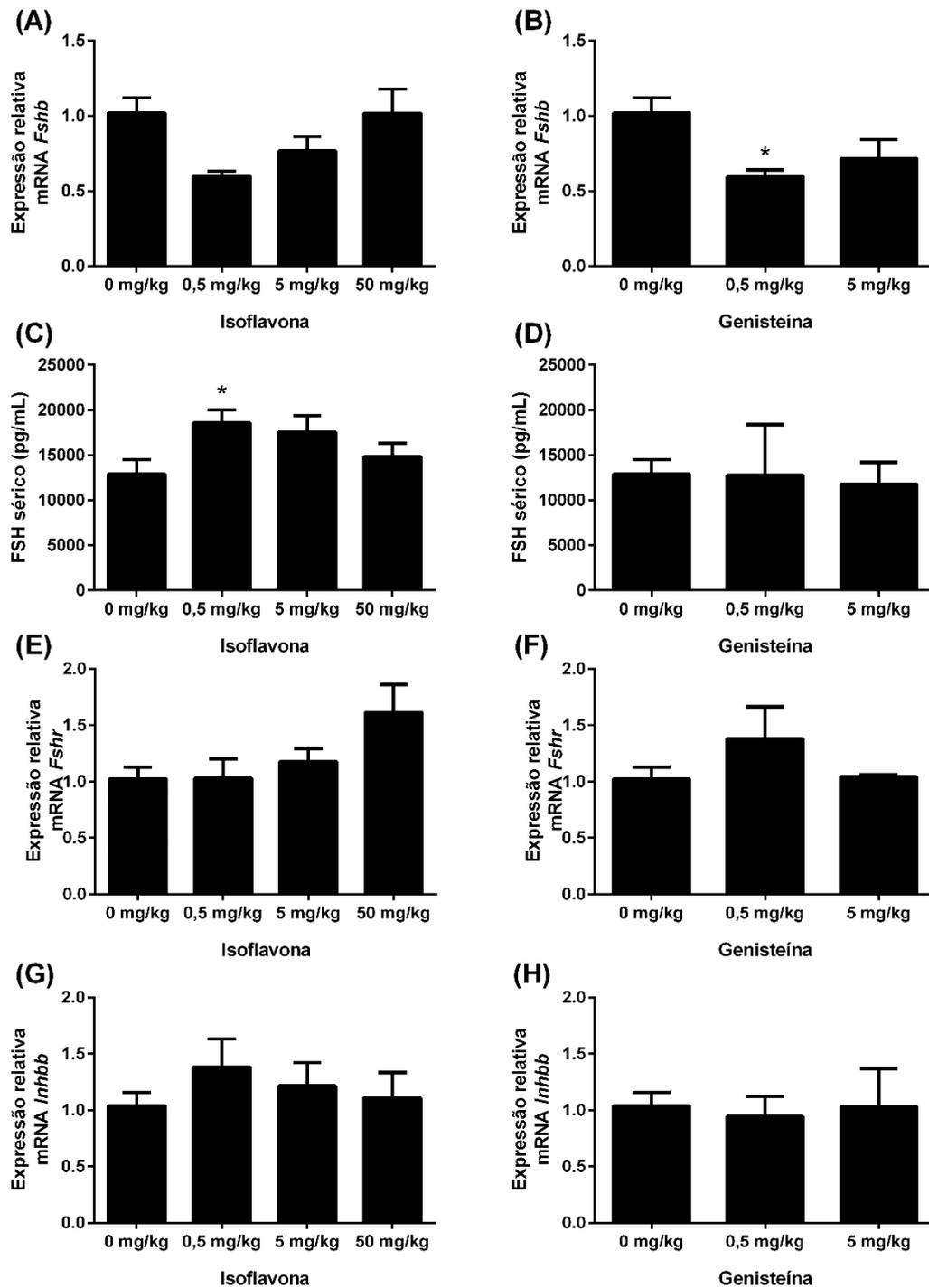


Figura 7- Expressão hipofisária dos transcritos de *Fshb* (A,B), nível de FSH sérico (C,D) e expressão testicular dos transcritos de *Fshr* (E,F) e *Inhbb* (G,H) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas, ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett); * $p < 0,05$, $n = 7$ /grupo. *Fshb*/*Fsh*: hormônio folículo estimulante; *Fshr*: receptor de hormônio folículo estimulante; *Inhbb*: inibina beta E.P.M.: erro padrão da média.

5.5 Testosterona sérica, Aromatase e Estradiol sérico

A testosterona pode se ligar ao receptor de andrógeno (*Ar*) e desempenhar funções virilizantes ou ainda pode ser convertida em estradiol por meio da ação da enzima aromatase. Por sua vez o estradiol exerce ação de infra regulação ao se ligar a seus receptores (*Esr1* e *Esr2*) presentes no hipotálamo e hipófise regulando a síntese e liberação de *Gnrh1* e LH (CAVALLIN et al., 2018; KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018). Assim, as subsequentes análises tiveram como objetivo quantificar o nível de testosterona e estradiol no sangue, a expressão da aromatase no testículo e a expressão dos transcritos *Ar*, *Esr1* e *Esr2*, a nível hipotalâmico e hipofisário, a fim de avaliar a integridade da produção dos hormônios, os mecanismos de infra regulação e conseqüentemente o comprometimento ou não da função reprodutiva.

O nível de testosterona sérica (Figura 8A) diminuiu nas doses de 0,5 e 5 mg/kg de exposição a isoflavonas, já o grupo de 50 mg/kg não demonstrou diferença estatística ($p=0,07$), enquanto nos grupos tratados com genisteína não ocorreu alteração (Figura 8B). Não foram encontradas alterações significativas na expressão da aromatase em ambos os grupos tratados (Figura 8C e 8D). Já o estradiol sérico reduziu nos grupos expostos a isoflavonas (Figura 8E) na dose de 0,5 e 5 mg/kg ($p<0,05$) e não mostrou alterações no grupo tratado com genisteína (Figura 8F).

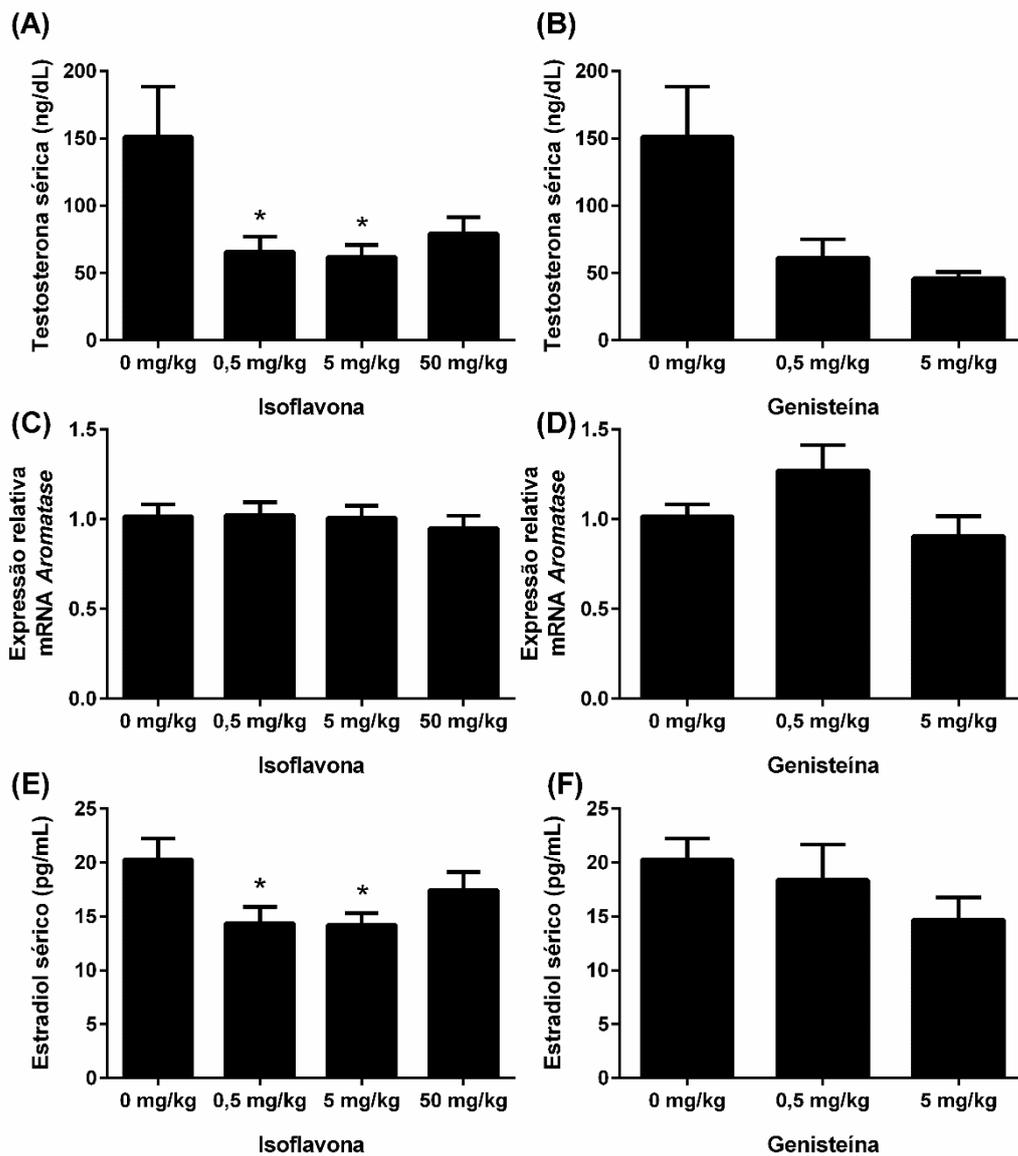


Figura 8- Nível de testosterona sérica (A,B), expressão testicular de aromatase (C,D) e estradiol sérico (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50mg/kg de isoflavonas ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett); * $p < 0,05$, $n = 7$ /grupo. E.P.M.: erro padrão da média.

5.6 *Ar*, *Esr1* e *Esr2* no hipotálamo

Não foram obtidas modificações em relação à expressão do transcrito *Ar* nos grupos tratados com isoflavonas (Figura 9A) ou com genisteína (Figura 9B). Em relação ao transcrito *Esr1*, as doses de 0,5 e 5 mg/kg de isoflavonas (Figura 9C) aumentaram a expressão do transcrito, resultado não encontrado para a dose de 50 mg/kg ($p=0.08$), enquanto a exposição

a genisteína não alterou a expressão deste (Figura 9D). Na avaliação do transcrito de *Esr2*, não houve alteração na expressão nos grupos tratados com isoflavonas, porém, houve uma redução na expressão deste no grupo tratado com 5 mg/kg de genisteína (Figura 9F).

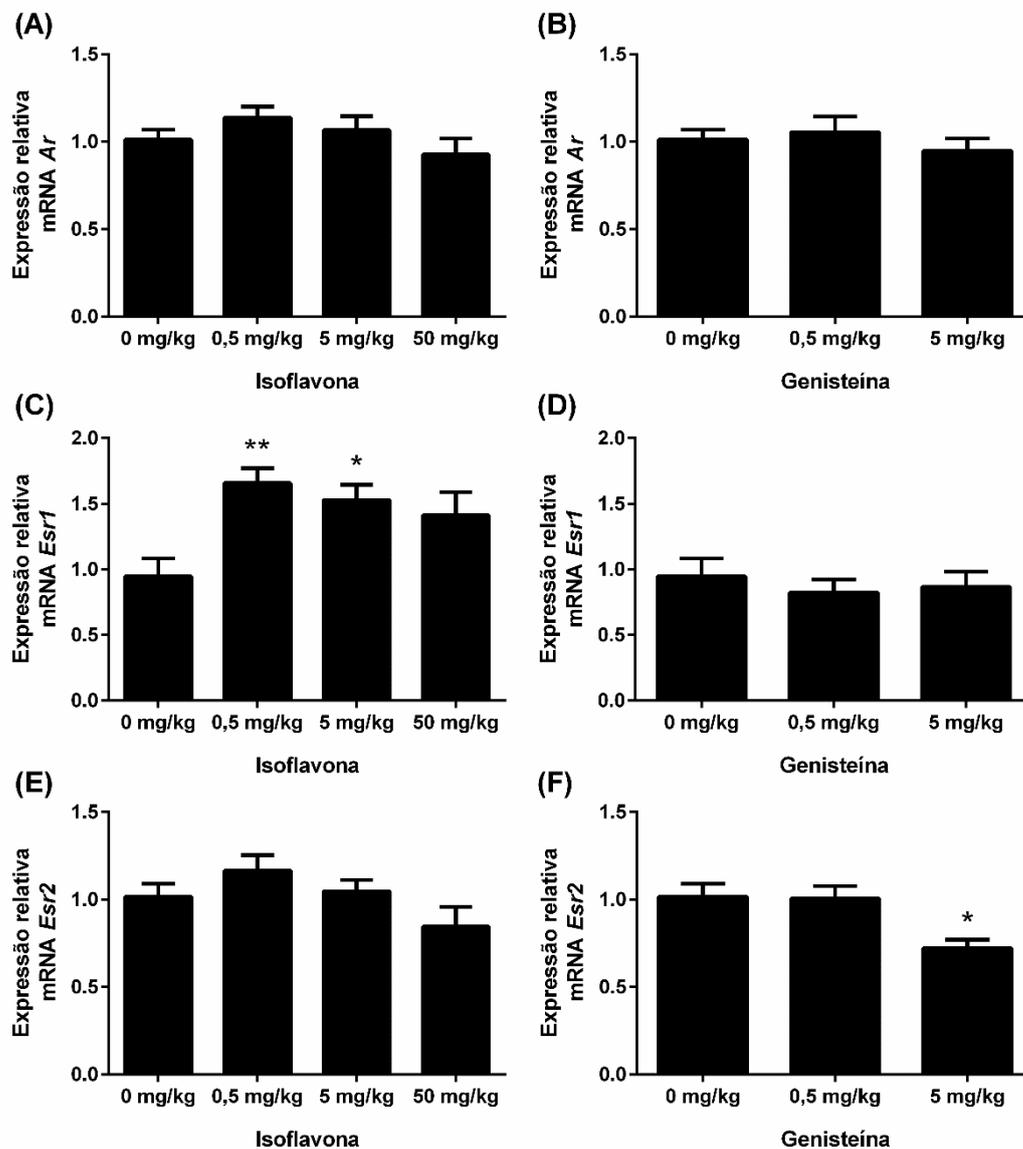


Figura 9- Expressão hipotalâmica dos transcritos de *Ar* (A,B), *Esr1* (C,D) e *Esr2* (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50 mg/kg de isoflavonas ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett); * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, $n = 7$ /grupo. *Ar*: Receptor de andrógeno; *Esr1*: receptor de estradiol 1; *Esr2*: Receptor de estradiol 2; E.P.M.: erro padrão da média.

5.7 *Ar*, *Esr1* e *Esr2* na hipófise

Na avaliação dos transcritos hipofisários, somente a expressão do *Ar* diminuiu no grupo tratado com isoflavonas (Figura 10A) na dose de 50 mg/kg, as doses de 0,5 e 5 mg/kg não apresentam alterações significativas, apenas mostram uma tendência estatística a uma diminuição da expressão ($p=0,06$ e $p=0,07$ respectivamente). Os demais transcritos avaliados não demonstraram alterações em relação as suas expressões.

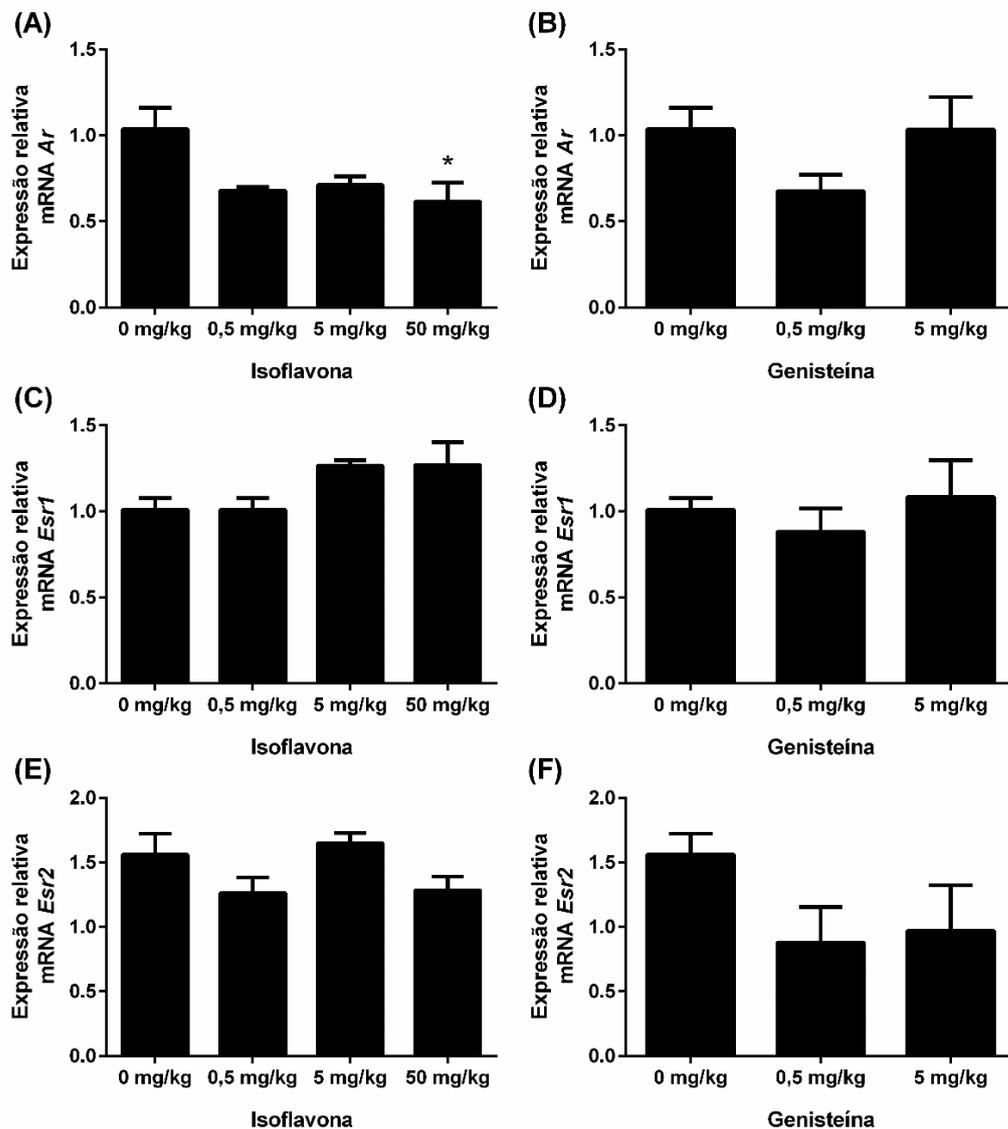


Figura 10- Expressão hipofisária dos transcritos de *Ar* (A,B), *Esr1* (C,D) e *Esr2* (E,F) em ratos controle (0 mg/kg) e ratos expostos a concentrações de 0,5, 5 ou 50mg/kg de isoflavonas ou 0,5 e 5 mg/kg de genisteína. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett); * $p < 0,05$, $n = 7$ /grupo. *Ar*: Receptor de andrógeno; *Esr1*: receptor de estradiol 1; *Esr2*: Receptor de estradiol 2 E.P.M.: erro padrão da média.

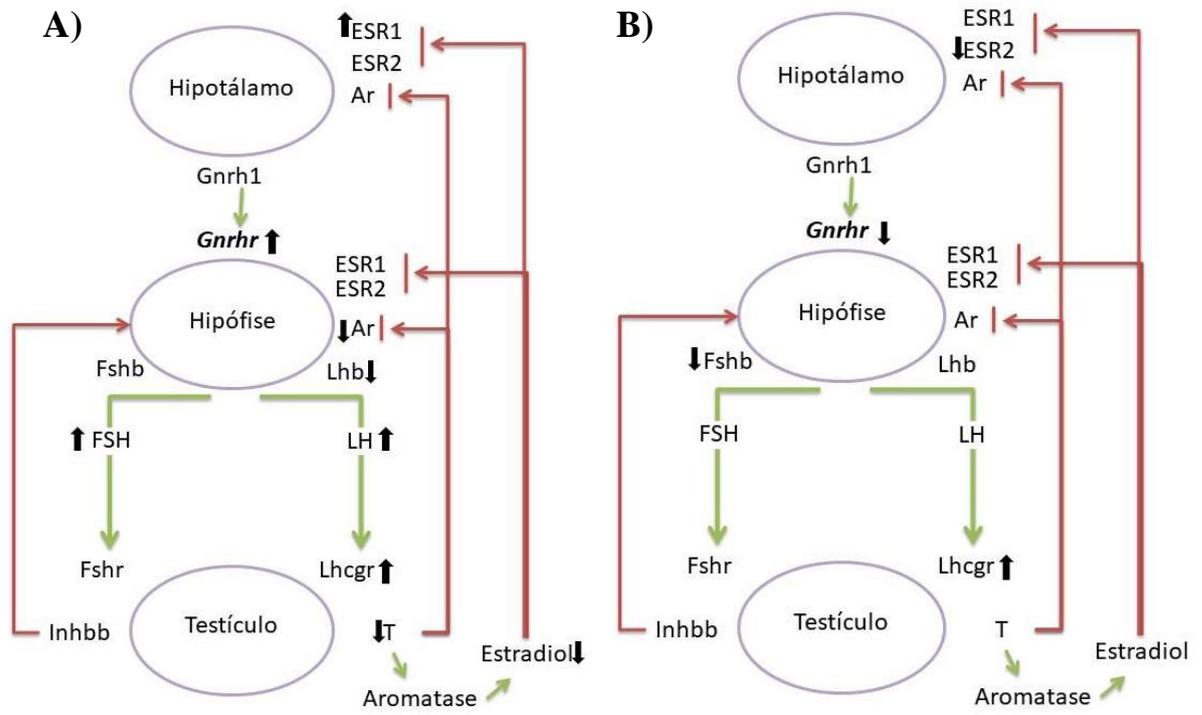


Figura 11- Resumos dos resultados. **A)** exposição a ISO e **B)** exposição a GEN.

6. DISCUSSÃO

Evidências apontam que a dieta tem um papel crucial no desenvolvimento e no momento da maturação sexual (VILLAMOR; JANSEN, 2016). Estudos demonstram que as isoflavonas presentes principalmente na soja e em alimentos derivados de soja tem um potencial desregulador endócrino devido a sua ação estrogênica, no entanto, os mecanismos e seus efeitos sobre a regulação hormonal do eixo HHT ainda não estão bem elucidados (KŘÍŽOVÁ et al., 2019).

A maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (HHT) é responsável por toda a regulação de hormônios ligados a função reprodutiva, ou seja, a plasticidade do início da puberdade e a maturação sexual pode ser um mecanismo que se adapta as condições em que o indivíduo é exposto predominantemente (PREVOT, 2014). Uma vez que essa fase é um período sensível a desregulação, cabe aqui destacar o conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DoHaD) (ROSEBOOM, 2019).

No presente estudo, foram avaliados os mecanismos hormonais envolvidos nos efeitos dose-resposta de isoflavonas (0,5, 5 e 50 mg/kg) e genisteína isolada (0,5 e 5 mg/kg) sobre a secreção das gonadotrofinas e a expressão de genes relacionados ao eixo reprodutivo durante o período pré-púbere até a idade adulta, utilizando ratos Wistar como modelo experimental. Muitos mecanismos podem estar envolvidos nas alterações encontradas, por tanto, os resultados discutidos a seguir têm como finalidade compreender melhor os efeitos toxicológicos pelos quais as isoflavonas e a genisteína isolada causam alteração no eixo reprodutivo.

A evolução do peso corporal foi avaliada através da pesagem diária dos animais do PND23 até o PND60, onde foi possível observar que a exposição a ISO e GEN não causaram alterações que pudessem refletir no desenvolvimento corporal normal dos animais. Em um estudo realizado por An et al., (2018), a exposição ao leite de soja em diferentes concentrações em ratos fêmeas e machos durante o período do GD6 ao PND57, sob avaliação dos efeitos das isoflavonas, também não observaram alterações no peso dos animais, demonstrando que o leite de soja não interfere no parâmetro de evolução do crescimento corporal.

Em outro estudo de Roberts et al., (2000), avaliaram a exposição a genisteína, fornecendo uma dieta com 5 mg/kg de genisteína na ração, em diferentes grupos e períodos de desenvolvimento, sendo eles um grupo do GD17 ao PND21, e outros dois grupos que continuaram recebendo a dieta do PND21 até a eutanásia aos 70 dias de idade ou 130 dias de

idade. O peso corporal dos animais foi acompanhado semanalmente e os resultados demonstram que não houve diferenças significativas nos pesos corporais dos animais expostos até o PND21 e PND70, porém, os animais expostos até os 130 dias de idade apresentaram um peso maior comparado aos outros grupos.

Segundo Faqi et al., (2004), pequenas alterações observadas no peso corporal de animais expostos a isoflavonas podem corresponder a variabilidade genética dos indivíduos, ao invés de um efeito biologicamente significativo resultante da exposição. O aumento do peso ainda pode ser explicado devido a fisiologia normal que ocorre na puberdade. É de conhecimento que o peso corporal em ratos nessa fase começa a aumentar (CACERES et al., 2015).

Em relação a progressão da puberdade o parâmetro utilizado para a avaliação foi a separação balanoprepucial, que nada mais é do que o descolamento da membrana prepucial e a externalização da glândula peniana. Esse processo se correlaciona diretamente com o aumento da testosterona sérica que ocorre nessa fase caracterizando o início da maturação reprodutiva (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 2005). No presente estudo, os animais expostos a ISO e a GEN tiveram o início da puberdade mais tardiamente quando comparados aos animais do grupo controle, observou-se que houve alteração em ambos os grupos tratados. Sugere-se que o atraso da puberdade pode ter ocorrido pela ação inibitória prolongada dos neurônios do eixo reprodutivo. O peso dos animais associado à puberdade também aumentou no grupo tratado com GEN. Essas observações sugerem que houve perturbação hormonal no período pré-púbere.

Os EDCs possuem a capacidade de perturbar os hormônios e interferir nas sínteses e secreção destes pela ação estrogênica ou antiandrogênica em diferentes níveis do eixo HHT, causando assim atraso no início da puberdade masculina. Esses compostos podem agir inibindo a secreção de gonadotrofinas através do feedback negativo (CAVALLIN et al., 2018; HOWARD; DUNKEL, 2019; MOURITSEN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

Ao avaliar os transcritos no hipotálamo pode-se observar que tanto na exposição a ISO quanto a GEN houve algumas alterações na expressão dos genes. No período pré-púbere, uma liberação pulsátil de GnRH é aumentada e os eventos estimuladores levam a produção e liberação de LH e FSH da hipófise, que executará sua ação nas células testiculares (KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018). O mecanismo envolvido na regulação do *Gnrh1* é bem complexo, sugere-se que os receptores de estradiol medeiam a atividade dos neurônios produtores de GnRH, sendo estes altamente expressos no hipotálamo (ALOTAIBI, 2019; KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018).

A interação entre as isoflavonas e os *Ers* desencadeia a ativação dos chamados elementos de resposta ao estrogênio localizados no lado interno da membrana nuclear. Deste modo, o mecanismo genômico, particularmente os processos de transcrição, podem ser afetados (PILSAKOVÁ; RIECANSKÝ; JAGLA, 2010).

Sabe-se que o estradiol exerce sua ação através da ligação aos seus receptores, a ligação ao *Esr2* ativa o complexo transcricional, promovendo a transcrição do GnRH, enquanto que a ativação do *Esr1* está envolvida na supressão da síntese e liberação do GnRH (CAVALLIN et al., 2018). No presente estudo, os receptores de estradiol tiveram alteração na sua expressão no hipotálamo. Na exposição a ISO a expressão gênica do *Esr1* aumentou nas doses de 0,5 e 5 mg/kg, sugerindo que a ação antiestrogênica das isoflavonas ocorreu diretamente no receptor desencadeando o efeito de infra regulação do *Gnrh1*.

Já na exposição a GEN, houve aumento na expressão de *Esr2* na dose de 5 mg/kg. Cada tipo de ISO tem diferentes afinidades com os *Ers*, isso pode explicar as diferenças nos resultados para a genisteína isolada, esta tem uma afinidade maior para o *Esr2* (HWANG et al., 2006; KŘÍŽOVÁ et al., 2019). A posição exata e o número de substituintes hidroxila na molécula de isoflavona influenciam na determinação da afinidade de ligação aos receptores. Por exemplo, a eliminação de um grupo hidroxila, como na daizeína, causa perda na afinidade em comparação com a alta afinidade de genisteína para o *Esr2* (SIVŇOV et al., 2018).

Apesar de ter ocorrido alterações nos receptores de estrogênio, a expressão de *Gnrh1* não teve alteração estatística relevante tanto na exposição com ISO quanto na exposição com GEN, sugerindo uma falta de resposta fisiológica. Apenas uma tendência a um aumento pode ser observada na exposição a isoflavonas nas doses de 0,5 e 5 mg/kg.

Em relação a expressão do receptor *Gnrhr*, houve um aumento na exposição a isoflavonas na dose de 50 mg/kg, enquanto que na dose de 5 mg/kg de genisteína houve uma diminuição da sua expressão. Já é bem definido que a secreção de GnRH no hipotálamo regula a expressão de seus receptores (*Gnrhr*) presentes na hipófise. Quando ocorre um declínio na liberação do hormônio GnRH, o número de receptores na hipófise diminui, porém a exposição subsequente da hipófise ao GnRH pode induzir e restaurar o número de receptores (BLISS et al., 2010; KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018).

Em um estudo que utilizou ratos adultos expostos ao equol (metabolito das isoflavonas) em doses de 100 e 250 mg/kg, o *Gnrhr* hipofisário também teve uma redução na sua expressão. Esse efeito pode ocorrer devido a uma ação direta nos gonadotrofos, diminuindo a sensibilidade dessas células ao estímulo pulsátil do *Gnrh1* ou ainda, devido a

um mecanismo indireto via atividade reduzida dos neurônios do *Gnrhl* hipotalâmico (LOUTCHANWOOT; SRIVILAI; JARRY, 2013).

Em ratos, o estradiol sérico também se correlaciona com o aumento do número de *Gnrhr*. O estradiol tem um efeito direto na hipófise e através de seus receptores agem de maneira a controlar a secreção do hormônio GnRH que conseqüentemente controla o número de seus receptores presentes na hipófise os *Gnrhr* (DAVIS et al., 2011; JANJIC; STOJILKOVIC; BJELOBABA, 2017). Dessa maneira é possível explicar as alterações encontradas no *Gnrhr* através da ação das isoflavonas sobre os *Ers*.

A ativação do *Gnrhr* estimula a produção e a secreção das gonadotrofinas na hipófise. A síntese de LH e FSH é regulada pelos genes *Lhb* e *Fshb*. As análises deste estudo mostram que a expressão de *Lhb* diminuiu na exposição a ISO na menor dose. A expressão dos genes *Lhb* e *Fshb* respondem diferentemente a pulsatilidade do *Gnrhl* sendo que a expressão de *Fshb* é preferencialmente estimulada com baixos níveis de *Gnrhl* e a expressão de *Lhb* é preferencialmente estimulada com altos níveis de *Gnrhl* (STAMATIADES; KAISER, 2018; THOMPSON; KAISER, 2014).

Lhb e *Fshb* podem ser regulados também pelo mecanismo de infra regulação exercido pelos esteroides sexuais produzidos pela gônada. O *Lhb* pode ser inibido pela ação da testosterona através de seus receptores *Ar* na hipófise ou ainda pela ação do estradiol. Este se liga a seus receptores *Ers* na hipófise regulando *Lhb* através da infra regulação. Já o *Fshb* é regulado pela ação da inibina, glicoproteína sintetizada pelas células de Sertoli que atua nos gonadotrofos reduzindo os níveis de *Fshb* (BERNARD et al., 2019; CHIMENTO et al., 2014; KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018).

A baixa expressão de *Lhb* pela exposição a ISO pode ter ocorrido devido a uma possível falta de resposta do *Gnrhl*, já que o *Lhb* é responsivo a níveis de *Gnrhl* mais altos ou ainda pela ligação das isoflavonas nos receptores *Esr1*, que suprime a expressão dos genes.

Já a expressão do *Fshb* também teve uma redução, porém, na exposição à GEN na menor dose. Embora não tenha ocorrido alteração na expressão da Inibina que possa justificar a redução do *Fshb*, sugere-se que a diminuição da expressão do *Gnrhr* na hipófise após a exposição a GEN, diminua o estímulo do *Gnrhl* sobre o gene. Em humanos adultos, os níveis de inibina são inversamente correlacionados com o FSH sérico e positivamente correlacionados com o número de células de Sertoli (KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018).

As concentrações séricas de LH e FSH neste trabalho se apresentaram aumentadas na exposição a isoflavonas, esse fato pode estar relacionado a mecanismos envolvidos na

regulação pós-transcricional, como a meia-vida do mRNA no citoplasma, a taxa de tradução do mRNA ou ainda a secreção alterada de gonadotropina (CAVALLIN et al., 2018).

No trabalho de Caceres et al., (2019), a exposição pré-pubere a uma mistura de isoflavonas em baixas doses (17 mg/kg de genisteína+12 mg/kg de daidzeína) e altas doses (170 mg/kg de genisteína+120 mg/kg de daidzeína) durante 5 semanas a partir do PND30, aumentou a concentração sérica de LH no grupo exposto a baixas doses, enquanto que no grupo de alta dose não houve aumento significativo.

Embora na exposição a isoflavonas o FSH sérico tenha se mostrado elevado, não foram encontradas alterações significativas do *Fshr* nos testículos, apenas uma tendência estatística ao aumento foi observada ($p=0.07$).

A expressão do genes *Lhcgr* e *Fshr* presentes nos testículos é estimulada pela produção de LH e FSH e desempenham suas funções na produção dos esteroides e na espermatogênese (ODUWOLE; PELTOKETO; HUHTANIEMI, 2018). Os resultados desse trabalho mostram que a expressão de *Lhcgr* aumentou após exposição a ISO na dose de 50 mg/kg esse achado pode estar correlacionado em resposta ao aumento de LH sérico.

Já na exposição a GEN a expressão do *Lhcgr* também aumentou, porém não foram encontradas alterações nos níveis de LH sérico nesse grupo. Sherrill et al. (2010) expôs ratos do GD 12 ao PND 21 a uma dieta contendo isoflavonas e observou aumento de *Lhcgr* nas doses de 5 e 50 mg/kg e explicou que é possível que a proliferação das células de Leydig causada pela dieta com isoflavonas, esteja associada à regulação positiva de *Lhcgr*, as alterações nos níveis de expressão gênica para fatores de transcrição podem amplificar ou diminuir a sinalização estimulada por hormônios.

Em relação a testosterona sérica, mesmo com o aumento do receptor *Lhcgr* no testículo em ambos os grupos tratados, não houve alteração na secreção do hormônio na exposição a GEN, porém, na exposição a ISO a produção de testosterona foi diminuída. Isso pode ser explicado pela interferência da genisteína no acoplamento dos receptores *Lhcgr* às proteínas G. O desacoplamento do *Lhcgr* das proteínas G afeta adversamente a função da adenilato ciclase e consequentemente afeta a estimulação dependente de LH das células de Leydig (HANCOCK et al., 2009).

Caceres et al., (2019) em seu estudo também observou redução da concentração sérica de testosterona nos dois grupos tratados com uma mistura de isoflanovas quando comparados ao grupo controle. Um outro estudo também de Caceres et al., (2015), sobre os efeitos das isoflavonas no início da puberdade de ratos, também demonstrou uma redução da testosterona sérica. Isso pode ser explicado devido ao fato das isoflavonas terem um mecanismo de infra

regulação semelhante ao estrogênio e essa inibição levaria a uma diminuição na síntese de testosterona, esse resultado também explica o atraso na puberdade.

Essa redução do andrógeno pelas isoflavonas ainda pode ser explicada por vias não convencionais. A diminuição da testosterona pode ocorrer devido a diminuição da atividade das enzimas esteroidogênicas nos testículos, essas enzimas desempenham um papel de regulação na síntese dos hormônios esteroides. As isoflavonas podem reduzir a síntese de testosterona nas células de Leydig, tendo ação direta na inibição da 3β -hidroxiesteróide desidrogenase (3β -HSD), enzima envolvida na conversão de colesterol em testosterona, e na indução da secreção de adiponectina, que por sua vez, pode fazer a supressão da proteína StAR e reduzir a testosterona (ARYANI et al., 2019; SIVONŇOV et al., 2018).

A adiponectina é a adipocina plasmática mais abundante produzida pelo tecido adiposo branco, mais precisamente secretada pelos adipócitos. Vários estudos mostram que a adiponectina também pode ser um dos hormônios que controlam a interação entre balanço energético e a fertilidade. Seus dois receptores, AdipoR1 e AdipoR2, são expressos no eixo HHT, e a sua ativação é capaz de regular a expressão e/ou secreção da Kisspeptina, *Gnrh1* e gonadotrofinas (BARBE et al., 2019).

Experimentos demonstram que a adiponectina age por meio de seus receptores diretamente nas células de Leydig, diminuindo a secreção de andrógenos associado a inibição da proteína StAR, e após a exposição com isoflavonas, os níveis séricos de adiponectina aumentaram e conseqüentemente diminuiu os níveis séricos de testosterona. Sabe-se que o estrogênio é um dos principais reguladores da adipogênese e essa influência se dá pela presença de receptores de estrogênio no tecido adiposo, uma vez que a exposição a isoflavonas pode alterar a expressão desses receptores, é possível que esse fator contribua para alterações na expressão da adiponectina (PFAEHLER et al., 2012; RAK et al., 2017).

Em ratos na puberdade a expressão da proteína AdipoR2 é aumentada nas células de Leydig, tornando as células mais sensíveis à adiponectina, além disso, em camundongos, foi demonstrado que a concentração sérica desta também aumenta nesse período (BARBE et al., 2019; RAK et al., 2017).

A testosterona medeia seus efeitos através da ligação aos seus receptores AR. Esses receptores estão presentes em vários tecidos incluindo hipotálamo e hipófise. Além dos efeitos estimulatórios que a testosterona exerce, essa também faz infra regulação sob o hipotálamo nos neurônios da Kisspeptina controlando a secreção de GnRH e conseqüentemente o LH na hipófise (MHAOUTY-KODJA, 2018). No presente estudo a expressão de AR foi diminuída na hipófise em ratos tratados com ISO na maior dose,

enfraquecendo o mecanismo de infra regulação. A expressão do AR pode ser controlada pela ação dos andrógenos e estrógenos (KUMAR; THAKUR, 2004; MCABEE; DONCARLOS, 1999) e o baixo nível de testosterona de estradiol pode justificar a baixa expressão do AR.

Uma vez que a testosterona é sintetizada essa pode agir sobre as células de Sertoli ou ainda pode sofrer ação da enzima aromatase e ser convertida em estradiol. O estrogênio possui um efeito fisiológico direto nas células que desencadeiam a espermatogênese completa e de maneira correta. Este regula a síntese de testosterona nas células de Leydig, além de, desempenhar papel na infra regulação sobre a secreção de gonadotrofinas na hipófise (ARYANI et al., 2019).

O presente estudo demonstra que há uma redução nos níveis séricos de estradiol nos grupos tratados com ISO. Mesmo que não tenham ocorrido diferenças significativas na expressão da aromatase, presume-se que a redução de estradiol seja consequência dos baixos níveis de testosterona. Alguns estudos mostram que as isoflavonas reduzem a aromatase (HINFRAY et al., 2018; IANNONE et al., 2019). Porém, foi relatado que a atividade da aromatase é inibida apenas em baixas concentrações de isoflavonas, enquanto que os altos níveis de isoflavonas aumentam a atividade dessa enzima (PILSAKOVÁ; RIECANSKÝ; JAGLA, 2010).

Os efeitos das isoflavonas também são dependentes do nível de estradiol endógeno, uma vez que estes competem pelo mesmo alvo de ligação, os *Ers*. Em altos níveis de estrógenos endógenos, as isoflavonas podem diminuir a atividade estrogênica total, ocupando uma parte dos *Ers*. Por outro lado, baixos níveis de estrógeno endógenos, as isoflavonas podem desempenhar ação estimulatória (PILSAKOVÁ; RIECANSKÝ; JAGLA, 2010).

As diferenças encontradas em estudos podem ser atribuídas devido ao tipo de isoflavona escolhida para cada experimento. Cada estudo utiliza uma administração de diferentes misturas, contendo diferentes isoflavonas e diferentes doses e, além disso, é possível que haja aderentes desconhecidos que possam interferir nos resultados (CACERES et al., 2014). Além disso, as isoflavonas podem exercer efeitos diversos, pois estas possuem diferentes afinidades com os receptores e ainda as funções de cada um podem exibir uma maior ou menor atividade biológica dependendo dos seus metabólitos que são mais ativos que seus precursores (HWANG et al., 2006).

Pela análise feita dos resultados o que se pode observar é que alguns genes e hormônios tiveram alterações após exposição a isoflavonas que não foram encontradas na exposição a genisteína isolada. Isso sugere que os outros tipos de isoflavona que não a genisteína, tiveram um efeito desregulador sobre os genes e hormônios.

Outro mecanismo pelo qual pode-se explicar as diferenças em respostas encontradas em doses mais baixas e não em doses mais altas é pela dinâmica de ocupação dos receptores. A relação entre a concentração de hormônios e a ocupação dos receptores não é linear, do mesmo modo, o número de receptores ligados e o maior efeito biológico também não é linear. Sendo assim, concentrações mais baixas de hormônios podem induzir a uma ligação maior aos receptores, enquanto que concentrações mais altas de hormônios resulta em uma menor ocupação de receptores (VANDENBERG et al., 2012; WELSHONS et al., 2003).

Os EDCs podem desempenhar nesse sentido o mesmo que os hormônios, podendo resultar em respostas mais pronunciadas em doses mais baixas do que doses mais altas de exposição. Essa característica dos EDCs, de não apresentar um padrão clássico de toxicologia, dificulta a determinação de parâmetros com o LOAEL (nível de efeito adverso mais baixo observado) e NOAEL (nível de efeito adverso não observado) (VANDENBERG et al., 2012).

7. CONCLUSÃO

As isoflavonas estão presentes na dieta principalmente em alimentos contendo soja e podem apresentar ações semelhantes ao estradiol endógeno. Nos últimos anos o consumo de isoflavonas cresceu entre a população e vem causando preocupações enquanto aos seus efeitos na saúde. Já é conhecido que o momento da pré-puberdade é extremamente sensível a desregulação endócrina devido as grandes alterações que acontecem a nível de genes e hormônios que regulam a maturação sexual. Nesse estudo a exposição pré-púbere a isoflavonas e genisteína modulou a expressão dos genes e o nível sérico de hormônios relacionados ao eixo HHT, interferindo nos mecanismos de sinalização do início da puberdade, mostrando que há uma desregulação endócrina nesse período se estendendo até a vida adulta.

Outros estudos realizados investigaram também as consequências da exposição a isoflavonas ao longo da vida sobre a produção espermática. Estes apontam que há uma diminuição do tamanho da ninhada em 21%, redução na contagem de espermatozoides de 25%, redução de gene específico da célula germinativa envolvido na glicose e mobilidade dos espermatozoides (Gapd-s), além da diminuição da vesícula seminal (CEDERROTH et al., 2010; EUSTACHE et al., 2009).

Embora os resultados encontrados no presente trabalho sejam relevantes e demonstrem alguns mecanismos pelos quais as isoflavonas podem alterar o eixo reprodutivo, ainda se faz necessário a realização de outros estudos para melhor compreensão desses efeitos.

8. REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A. et al. Impact of prepubertal exposure to dietary protocatechuic acid on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 290, p. 99–109, jun. 2018.
- AKINGBEMI, B. T. et al. Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular leydig cells in the adult rat. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4475–4488, 2007.
- ALOTAIBI, M. F. **Physiology of puberty in boys and girls and pathological disorders affecting its onset** *Journal of Adolescence*, fev. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140197118302239>>. Acesso em: 22 ago. 2019
- AN, E. S. et al. Effects of a soybean milk product on feto-neonatal development in rats. **Journal of Biomedical Research**, v. 32, n. 1, p. 51–57, 2018.
- ANDERSSON, A.-M. Different Roles of Prepubertal and Postpubertal Germ Cells and Sertoli Cells in the Regulation of Serum Inhibin B Levels. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 12, p. 4451–4458, 1998.
- ARYANI, R. et al. The effect of methanol extract of soybean (*Glycine max* L. Merr.) on rat testicular steroid hormones . **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1277, p. 012012, 2019.
- BARBE, A. et al. Mechanisms of adiponectin action in fertility: An overview from gametogenesis to gestation in humans and animal models in normal and pathological conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019.
- BECÚ-VILLALOBOS, D. et al. Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 17, n. 6, p. 699–715, 1997.
- BEEKMANN, K. et al. The effect of glucuronidation on isoflavone induced estrogen receptor (ER) α and ER β mediated coregulator interactions. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, p. 245–253, 2015.
- BELL, M. R. Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. v. 159, n. July, p. 2596–2613, 2018.
- BERNARD, D. J. et al. Regulation of Gonadotropins. **Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience**, n. October, p. 1–30, 2019.
- BETTINELLI, M. E. et al. Knowledge of Health Professionals Regarding Vegetarian Diets from Pregnancy to Adolescence: An Observational Study. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 3–11, 2019.
- BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling:

- Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 4, p. 833–842, 2005.
- BLISS, S. P. et al. **GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility** **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923852/pdf/nihms-208591.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2019
- BOIS, C. et al. Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 45, n. 3, p. 147–159, 2010.
- BUZZARD, J. J. et al. Changes in circulating and testicular levels of inhibin A and B and activin A during postnatal development in the rat. **Endocrinology**, v. 145, n. 7, p. 3532–3541, 2004.
- CACERES, S. et al. The Effects of isoflavones on androgens and glucocorticoids during puberty on male wistar rats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 4, p. 611–617, 2014.
- CACERES, S. et al. Isoflavones and their effects on the onset of puberty in male Wistar rats. **Andrologia**, v. 47, n. 10, p. 1139–1146, 2015.
- CACERES, S. et al. Effects of soya milk on reproductive hormones during puberty in male Wistar rats. **Reproduction in Domestic Animals**, n. November 2018, p. 855–863, 2019.
- CAMPOS, P. DE et al. Maternal bisphenol A exposure disrupts spermatogenesis in adult rat offspring. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 3, p. 1–13, 2019.
- CARREAU, S.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogens - New players in spermatogenesis. **Reproductive Biology**, v. 11, n. 3, p. 174–193, 2011.
- CAVALLIN, M. D. et al. The hypothalamic-pituitary-testicular axis and the testicular function are modulated after silver nanoparticle exposure. **Toxicology Research**, v. 7, n. 1, p. 102–116, 2018.
- CEDERROTH, C. R. et al. Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 321, n. 2, p. 152–160, jun. 2010.
- CHAN, V. et al. Ontogeny of Pituitary GnRH Receptors in the Rat. **Endocrinology**, v. 108, n. 6, p. 2086–2092, 1981.
- CHEN, J.; LIN, H.; HU, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 304, n. 3, p. 1228–35, 2003.
- CHIMENTO, A. et al. **Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen**

- receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis** *Frontiers in Endocrinology*, 2014. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 15 fev. 2019
- CHOWDHURY, M.; STEINBERGER, E. Pituitary and Plasma Levels of Gonadotrophins. 1975.
- CLAVIJO, R. I.; HSIAO, W. Update on male reproductive endocrinology. **Translational Andrology and Urology**, v. 7, n. S3, p. S367–S372, 2018.
- CLEGG, D. et al. **Sex hormones and cardiometabolic health: Role of estrogen and estrogen receptors** *Endocrinology*, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo>. Acesso em: 13 mar. 2019
- COMBARNOUS, Y.; NGUYEN, T. M. D. Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. **Toxics**, v. 7, n. 1, p. 5, 24 jan. 2019.
- CREASY, D. M.; CHAPIN, R. E. **Male Reproductive System**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- DAVIS, T. L. et al. Does a Nonclassical Signaling Mechanism Underlie an Increase of Estradiol-Mediated Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Binding in Ovine Pituitary Cells?1. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 4, p. 770–778, 2011.
- DE SOUZA, J. S. et al. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. **Toxicology**, v. 377, p. 25–37, fev. 2017.
- DÖHLER, K. D.; WUTTKE, W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. **Endocrinology**, v. 97, n. 4, p. 898–907, out. 1975.
- DUBOIS, P. M. Ontogeny of Hypothalamic Luteinizing Hormone-. v. 116, n. 4, 1985.
- DUITAMA, S. M. et al. Soy protein supplement intake for 12 months has no effect on sexual maturation and may improve nutritional status in pre-pubertal children. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 54, n. 9, p. 997–1004, 2018.
- DZIEWIRSKA, E.; HANKE, W.; JUREWICZ, J. Environmental non-persistent endocrine-disrupting chemicals exposure and reproductive hormones levels in adult men. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 31, n. 5, p. 551–573, 18 set. 2018.
- ELANGOVAN, A. et al. Food advanced glycation end products as potential endocrine disruptors: An emerging threat to contemporary and future generation. **Environment International**, v. 123, p. 486–500, fev. 2019.

- EUSTACHE, F. et al. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 8, p. 1272–1279, 2009.
- FAQI, A. S. et al. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 605–611, jun. 2004.
- FAULDS, M. H. et al. The diversity of sex steroid action: Regulation of metabolism by estrogen signaling. **Journal of Endocrinology**, v. 212, n. 1, p. 3–12, 2012.
- GAFFER, G. G. et al. Dietary soy isoflavones during pregnancy suppressed the immune function in male offspring albino rats. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 296–301, 2018.
- GOLDMAN, J. M. et al. **Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations** **Critical Reviews in Toxicology**, 29 jan. 2000. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408440091159194>>. Acesso em: 8 fev. 2019
- HANCOCK, K. D. et al. Genistein decreases androgen biosynthesis in rat Leydig cells by interference with luteinizing hormone-dependent signaling. **Toxicology Letters**, v. 184, n. 3, p. 169–175, 2009.
- HIKONO, H.; WATANABE, G. **Ontogeny of inhibin secretion in the rat testis_ secretion of inhibin-related proteins from fetal Leydig cells and of bioactive inhibin from Sertoli cells in_ Journal of Endocrinology Volume 155 Issue 1 Year 1997.pdf** **Article in Journal of Endocrinology**, 1997. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/13840077>>. Acesso em: 6 jun. 2019
- HINFRAY, N. et al. Mixture concentration-response modeling reveals antagonistic effects of estradiol and genistein in combination on brain aromatase gene (Cyp19a1b) in zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 2018.
- HIRAMATSU, E. Y. et al. Biotransformation processes in soymilk isoflavones to enhance anti-inflammatory potential in intestinal cellular model. **Journal of Food Biochemistry**, n. December 2019, p. 1–10, 2020.
- HO, S. M. et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. **Reproductive Toxicology**, v. 68, p. 85–104, mar. 2017.
- HOSPITAL, H.; FLOREY, H. **TESTOSTERONE LEVELS IN MALE RATS FROM. Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, p. 121–126, 1974.
- HOWARD, S. R.; DUNKEL, L. The Genetic Basis of Delayed Puberty. **Neuroendocrinology**, v. 106, n. 3, p. 283–291, 2019.

- HWANG, C. S. et al. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, n. 4–5, p. 246–253, nov. 2006.
- IANNONE, M. et al. Synthetic isoflavones and doping: A novel class of aromatase inhibitors? **Drug Testing and Analysis**, v. 11, n. 2, p. 208–214, 2019.
- JANJIC, M. M.; STOJILKOVIC, S. S.; BJELOBABA, I. Intrinsic and regulated gonadotropin-releasing hormone receptor gene transcription in mammalian pituitary gonadotrophs. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. SEP, p. 1–9, 2017.
- JAZWIEC, P. A.; SLOBODA, D. M. Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? **Journal of Endocrinology**, v. 242, n. 1, p. T51–T68, 2019.
- JIN, J. M.; YANG, W. X. **Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males***Gene*, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.048>>. Acesso em: 8 fev. 2019
- KAPRARA, A.; HUHTANIEMI, I. T. **The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men***Metabolism: Clinical and Experimental*, set. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002604951730330X>>. Acesso em: 8 fev. 2019
- KASPER-SONNENBERG, M. et al. Pre-pubertal exposure with phthalates and bisphenol A and pubertal development. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.
- KAVLOCK, R. J. et al. kavlock et al. **Environ Health Perspect**, v. 1, p. 715–740, 1996.
- KETELSLEGGERS, J. M. et al. Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: Plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. **Endocrinology**, v. 103, n. 1, p. 212–222, 1 jul. 1978.
- KNEZ, J. **Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health***Reproductive BioMedicine Online* AME Publications, , jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30050807>>. Acesso em: 22 fev. 2019
- KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I. T.; WEINER, R. I. Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat1. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 298–303, 2005.
- KŘÍŽOVÁ, L. et al. Isoflavones. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1076, 19 mar. 2019.
- KUMAR, R. C.; THAKUR, M. K. Androgen receptor mRNA is inversely regulated by testosterone and estradiol in adult mouse brain. **Neurobiology of Aging**, v. 25, n. 7, p. 925–933, ago. 2004.
- LANCIOTTI, L. et al. **Up-to-date review about minipuberty and overview on**

- hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation in fetal and neonatal life** *Frontiers in Endocrinology*, 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 11 fev. 2019
- LAURETTA, R. et al. Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on Endocrine Glands. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, p. 178, 2019.
- LEE, A. et al. New Evaluation of Isoflavone Exposure in the French Population. *Nutrients*, v. 11, n. 10, p. 2308, 28 set. 2019.
- LITTLETON-KEARNEY, M.; HURN, P. D. **Testosterone as a modulator of vascular behavior.** *Biological research for nursing*, abr. 2004. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1099800403262927>>. Acesso em: 12 mar. 2019
- LOPES, I. M. D. et al. The effects of silver nanoparticles exposure on the testicular antioxidant system during pre-pubertal rat stage. *Chemical Research in Toxicology*, p. acs.chemrestox.8b00281, 2019.
- LOUTCHANWOOT, P.; SRIVILAI, P.; JARRY, H. Effects of the natural endocrine disruptor equol on the pituitary function in adult male rats. *Toxicology*, v. 304, p. 69–75, 2013.
- LYMPERI, S.; GIWERCMAN, A. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 86, p. 79–90, set. 2018.
- MAJDIC, G. et al. Testicular Expression of Inhibin and Activin Subunits and Follistatin in the Rat and Human Fetus and Neonate and During Postnatal Development in the Rat *. v. 138, n. 5, p. 2136–2147, 1997.
- MAKANJI, Y. et al. Inhibin at 90: From Discovery to Clinical Application, a Historical Review. *Endocrine Reviews*, v. 35, n. 5, p. 747–794, 2014.
- MANTOVANI, A.; FUCIC, A. **Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action** *Reproductive Toxicology*, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.06.002>>. Acesso em: 7 fev. 2019
- MATHIAS, F. T. et al. Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. *Nanotoxicology*, v. 9, n. 1, p. 64–70, 2015.
- MATOSO, V. et al. **Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept** *Food Chemistry*, jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619301220>>. Acesso em: 29 abr. 2019
- MCABEE, M. D.; DONCARLOS, L. L. Estrogen, but not androgens, regulates androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in the developing male rat forebrain.

Endocrinology, v. 140, n. 8, p. 3674–3681, 1999.

MHAOUTY-KODJA, S. Role of the androgen receptor in the central nervous system.

Molecular and Cellular Endocrinology, v. 465, p. 103–112, 2018.

MOURITSEN, A. et al. **Hypothesis: Exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty**. *International Journal of Andrology*.

*Anais...*2010Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2605.2010.01051.x>>. Acesso em: 7 fev. 2019

NEMESK, A. R.; DETTA, A.; CLAYTON, R. N. Hypothalamic GnRH and Pituitary Gonadotroph Relationships during Rat Fetal Life. v. 88, n. 3, p. 275–284, 1986.

NETO, F. T. L. et al. **Spermatogenesis in humans and its affecting factors***Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>>. Acesso em: 11 mar. 2019

O'CONNOR, A. E.; DE KRETZER, D. M. Inhibins in normal male physiology. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 22, n. 3, p. 177–185, 2004.

O'SHAUGHNESSY, P. **Testicular Development**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 1

O'SHAUGHNESSY, P. J.; DUDLEY, K.; RAJAPAKSHA, W. R. A. K. J. S. Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 125, n. 1–2, p. 169–175, 1996.

ODUWOLE, O. O.; PELTOKETO, H.; HUHTANIEMI, I. T. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 763, 2018.

OLIVEIRA, I. M. et al. Delayed onset of puberty in male offspring from bisphenol A-treated dams is followed by the modulation of gene expression in the hypothalamic-pituitary-testis axis in adulthood. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 12, p. 2496–2505, 2017.

PATELAKIS, E. et al. Prevalence of vegetarian diet among children and adolescents in Germany Results from EsKiMo II. **Ernahrungs Umschau**, v. 66, n. 5, p. 85–91, 2019.

PATERNI, I.; GRANCHI, C.; MINUTOLO, F. **Risks and benefits related to alimentary exposure to xenoestrogens***Critical Reviews in Food Science and Nutrition*NIH Public Access, , 2 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26744831>>. Acesso em: 7 fev. 2019

PATISAUL, H. B. Endocrine disruption by dietary phyto-oestrogens: impact on dimorphic sexual systems and behaviours. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 76, n. 2, p. 130–144, 2017.

PAYNE, A. H. et al. Steroid Research Unit , Reproductive Endocrinology Program ,

Departments of Obstetrics. 1976.

PFAEHLER, A. et al. Regulation of adiponectin secretion by soy isoflavones has implication for endocrine function of the testis. **Toxicology Letters**, v. 209, n. 1, p. 78–85, 2012.

PICUT, C. A.; PARKER, G. A. **Postnatal Organ Development as a Complicating Factor in Juvenile Toxicity Studies in Rats**. Toxicologic Pathology. **Anais...**2017Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0192623316671609>>. Acesso em: 18 mar. 2019

PICUT, C. A.; REMICK, A. K. **Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologist's Perspective****Toxicologic Pathology**, 2017. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0192623316672744>>. Acesso em: 28 fev. 2019

PICUT, C. A.; ZIEJEWSKI, M. K.; STANISLAUS, D. **Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System****Birth Defects Research**Wiley Periodicals, Inc, , 2018. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bdr2.1133>>. Acesso em: 28 fev. 2019

PILSAKOVÁ, L.; RIECANSKÝ, I.; JAGLA, F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. **Physiological Research**, v. 59, n. 5, p. 651–664, 2010.

PINEDA, R. et al. Amygdala Kisspeptin Neurons: Putative Mediators of Olfactory Control of the Gonadotropic Axis. **Neuroendocrinology**, v. 104, n. 3, p. 223–238, 2017.

PREVOT, V. **Puberty in Mice and Rats**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 2

RAK, A. et al. Adiponectin and resistin: Potential metabolic signals affecting hypothalamo-pituitary gonadal axis in females and males of different species. **Reproduction**, v. 153, n. 6, p. R215–R226, 2017.

RANNIKKI, A. S.; ZHANG, F. P.; HUHTANIEMI, I. T. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 107, n. 2, p. 199–208, fev. 1995.

RATTAN, S.; FLAWS, J. A. The epigenetic impacts of endocrine disruptors on female reproduction across generations†. **Biology of Reproduction**, v. 0, n. May, p. 1–10, 2019.

ROBERTS, D. et al. 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. 281–286, 2000.

ROMANO, R. M. et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663–673, 2011.

ROSEBOOM, T. J. Epidemiological evidence for the developmental origins of health and

- disease: effects of prenatal undernutrition in humans. **The Journal of endocrinology**, v. 242, n. 1, p. T135–T144, 2019.
- RUDOLPH, L. M. et al. **Peripheral and Central Mechanisms Involved in the Hormonal Control of Male and Female Reproduction** **Journal of Neuroendocrinology**, 2016.
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5146987/pdf/nihms-833583.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2019
- RULLI, S. B.; CAMBIASSO, M. J.; RATNER, L. D. **Programming of the reproductive axis by hormonal and genetic manipulation in mice** **Reproduction**, 1 out. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30304933>>. Acesso em: 8 fev. 2019
- SCOTT, C. J. et al. **Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals**. *Animal Reproduction Science. Anais...* 2000 Disponível em: <www.elsevier.com/locate/reprousci>. Acesso em: 13 mar. 2019
- SEGOVIA-SIAPCO, G. et al. Soy isoflavone consumption and age at pubarche in adolescent males. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 2287–2294, 2017.
- SEONG, J. Y. et al. Discovery and Evolutionary History of GnIH and Kisspeptin: New Key Neuropeptides Controlling Reproduction. **Journal of Neuroendocrinology**, p. no-no, 2010.
- SETCHELL, K. D. R. The history and basic science development of soy isoflavones. **Menopause**, v. 24, n. 12, p. 1338–1350, dez. 2017.
- SHERRILL, J. D. et al. Developmental Exposures of Male Rats to Soy Isoflavones Impact Leydig Cell Differentiation1. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 488–501, 2010.
- SINGLA, R. K. et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. **Journal of AOAC International**, p. 1–4, 2019.
- SIVONŇOV, M. et al. Androgen receptor and soy isoflavones in prostate cancer (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, p. 191–204, 2018.
- SLEIMAN, H. K. et al. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 76, n. 17, p. 1023–1032, 2013.
- STAMATIADES, G. A.; KAISER, U. B. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 463, p. 131–141, 2018.
- STOKER, T. E. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals : Prepubertal Exposures and Effects on Sexual Maturation and Thyroid Function in the Male Rat . A Focus on the EDSTAC Recommendations. v. 30, n. 2, p. 197–252, 2000.
- STUMP, D. G. et al. Postnatal Development of the Testis in the Rat. **Toxicologic Pathology**,

v. 43, n. 3, p. 326–342, 2014.

TENA-SEMPERE, M. et al. Neonatal imprinting and regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNA expression by estrogen in the pituitary and hypothalamus of the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 73, n. 1, p. 12–25, 2001.

THOMPSON, I. R.; KAISER, U. B. **GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression** **Molecular and Cellular Endocrinology**, mar. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720713003742>>. Acesso em: 20 set. 2019

VAN DIE, M. D. et al. Soy and soy isoflavones in prostate cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BJU International**, v. 113, n. 5 B, 2014.

VANDENBERG, L. N. et al. **Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses** **Endocrine Reviews**, 2012.

VILLAMOR, E.; JANSEN, E. C. Nutritional Determinants of the Timing of Puberty. **Annual Review of Public Health**, v. 37, n. 1, p. 33–46, 2016.

VITO, C. C.; FOX, T. O. Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain. **Developmental Brain Research**, v. 2, n. 1, p. 97–110, ago. 1981.

WARREN, D. W. et al. Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. **Endocrinology**, v. 114, n. 2, p. 470–476, 1 fev. 1984.

WEISZ, J.; WARD, I. L. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. **Endocrinology**, v. 106, n. 1, p. 306–316, 1980.

WELSHONS, W. V. et al. **Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity** **Environmental Health Perspectives**, 2003.

XIAO, Y. et al. **Comprehensive evaluation of the role of soy and isoflavone supplementation in humans and animals over the past two decades** **Phytotherapy Research**, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ptr.5966>>. Acesso em: 7 fev. 2019

YOU, L.; SAR, M. Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. **Endocrine**, v. 9, n. 3, p. 253–261, 1998.

YOUNG, W. J.; CHANG, C. Ontogeny and autoregulation of androgen receptor mRNA expression in the nervous system. **Endocrine**, v. 9, n. 1, p. 79–88, 1998.

YU, Y. et al. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. **Nature communications**, v. 5, p. 3230, 2014.

ZHANG, L.; ZUO, Z.; LIN, G. Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids.
Molecular Pharmaceutics, v. 4, n. 6, p. 833–845, 2007.