



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Pós-graduação em Saúde e Nutrição



Dissertação

EFEITOS DO CONSUMO DE SOJA OU PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA POR
RATAS NA LACTAÇÃO SOBRE A FUNÇÃO DA MEDULA ADRENAL E
RESPOSTA ANTIOXIDANTE NA PROGÊNIE ADULTA

Maíra Schuchter Ferreira

Ouro Preto MG

2018

Maíra Schuchter Ferreira

EFEITOS DO CONSUMO DE SOJA OU PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA POR
RATAS NA LACTAÇÃO SOBRE A FUNÇÃO DA MEDULA ADRENAL E
RESPOSTA ANTIOXIDANTE NA PROGÊNIE ADULTA

Dissertação apresentada no Curso de Pós-Graduação em
Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto

Área de Concentração: Saúde e Nutrição

Linha de Pesquisa: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição

Orientadora: Dr^a. Aline Silva de Aguiar

Co-orientadora: Dr^a. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti

Ouro Preto

2018

F383e Ferreira, Maíra Schuchter.

Efeitos do consumo de soja ou proteína isolada de soja por ratas na lactação sobre a função da medula adrenal e resposta antioxidante na progênie adulta [manuscrito] / Maíra Schuchter Ferreira. – 2018. 103 f.; il.; color.;grafs.; tabs.

Orientadora: Profª Drª. Aline Silva de Aguiar

Orientadora: Profª. Drª Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição. Área de concentração: Saúde e Nutrição.

1. Soja - Dissertação. 2. Catecolaminas - Dissertação. 3. Atividade antioxidante - Dissertação I. Aguiar, Aline Silva de. II. Luquetti, Sheila Cristina Potente. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 613.2.038

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

ATA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO



UFOP

Universidade Federal de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição



ESCOLA DE NUTRIÇÃO / UFOP
SAÚDE A MENORIDADE

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos dezoito dias do mês de maio de dois mil e dezoito, às nove horas e trinta minutos, na sala 202, lado B no Centro de Educação Aberta e a Distância da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Maira Schuchter Ferreira**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos professores Marcelo Eustáquio Silva (UFOP), Cristiane Gonçalves de Oliveira Fialho (UFJF), Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti (UFJF) e Aline Silva de Aguiar (UFJF). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: “**Efeitos do consumo de soja e proteína isolada de soja por ratas na lactação sobre a função da medula adrenal e resposta antioxidante na progênie adulta**”. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento do Programa. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



APROVAR CONDICIONALMENTE



REPROVAR

Profa. Cristiane Gonçalves de Oliveira Fialho (UFJF),
Examinadora Externa.

Prof. Marcelo Eustáquio Silva (UFOP),
Examinador Interno.

Profa. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti (UFJF),
Coorientadora.

Profa. Aline Silva de Aguiar (UFJF),
Orientadora.

Maira Schuchter Ferreira,
Mestranda.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Lúcia e Gilberto*,
que, com muito carinho e apoio, me auxiliam e
incentivam a ser e fazer o melhor que posso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras Aline e Sheila que, desde à graduação, me auxiliaram com aprendizados sobre nutrição, estudo com animais, utilização de laboratórios, e me fizeram apaixonar pela pesquisa. Obrigada por me aceitarem de braços abertos.

Ao professor Raúl, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, obrigada por todos os ensinamentos, pela boa vontade, que o fizeram também meu orientador e conselheiro científico. À você o meu muito obrigada!

À Kacia e ao Silvioney, pela disposição, competência, paciência e ajuda na realização das análises. Sem vocês este projeto não teria fluído tão bem.

Às meninas do laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Juiz de Fora: Poliana, Adriana, Fran, Duda, Brenda, Milena, Vanessa, Camila, Ritielly e Ana Carolina, por fazerem a rotina do laboratório ser mais leve, prazerosa e divertida.

Aos meus pais, Lúcia e Gilberto. Obrigada pelo incentivo diário, por confiarem em mim e por me ensinarem que se perseveramos e acreditarmos iremos colher bons frutos. À vocês todo o meu amor, carinho, admiração e gratidão.

Às amigas que me acolheram em Ouro Preto: Mayra, Ana Paula, Jaísa e Josilene. Sem vocês minha trajetória por essa cidade não teria sido tão alegre, encantadora e inesquecível quanto foi. Obrigada por todas os momentos.

Ao Andrey, por participar de todas as etapas desta fase me dando muito apoio, carinho e amor. Obrigada pelo suporte e compreensão, por ser meu refúgio e me transmitir paz sempre que precisei. Obrigada por estar sempre presente.

À prof. Lucinha, Mayara, Juliana e Alice do Laboratório de Bioquímica Metabólica da Universidade Federal de Ouro Preto, por me receberem em seu laboratório e auxiliarem ativamente das análises de atividade antioxidante.

À Mariana, do Laboratório de Fisiologia Endócrina da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, por me receber em seu laboratório e pelo auxílio com a análise de expressão da tirosina hidroxilase.

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto por todo o suporte fornecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

À toda minha família e amigos que sempre torceram por mim. Obrigada pela preocupação, apoio e carinho, por compartilharem de momentos de descontração e dificuldades, fazendo cada obstáculo se tornar mais fácil de ser contornado.

À Deus por me conduzir e abençoar. O Teu amor cobre as minhas fraquezas e a Tua fidelidade é maior que os obstáculos na minha vida.

RESUMO

Introdução: Estudos têm relacionado o consumo de soja com efeitos benéficos ao organismo. Entretanto, por ser rica em fitoestrogênios, tem sido questionada a segurança do seu consumo e de seus derivados em fases críticas da vida. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do consumo de dieta a base de soja ou proteína isolada de soja durante a lactação sobre a função da medula adrenal, atividade antioxidante e índices de aterogenicidade em ratas lactantes e suas proles ao desmame e na idade adulta. **Metodologia:** Ratas Wistar lactantes com 6 filhotes machos foram divididas: Controle Caseína (C): dieta à base de caseína (ptn:16,3%; lip:7%); Proteína isolada de soja (PIS): dieta à base de proteína isolada de soja (ptn:18,3%; lip:7%); Soja (S): dieta à base de soja (ptn:20,1%; lip:16,8%). Ao desmame, 3 filhotes/ninhada, receberam ração comercial até os 150 dias. Ao final da lactação (21 dias) e na idade adulta (150 dias) avaliou-se ingestão alimentar (IA), massa corporal (MC); índices de aterogenicidade 1 (CT/HDL), 2 (LDL/HDL) e 3 [(CT-HDL)/HDL], atividade hepática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e biomarcadores do estresse oxidativo: TBARS e relação redox (glutaciona reduzida/glutaciona oxidada [GSH/GSSG]); colesterol e triglicérido (TG) hepático; conteúdo absoluto e relativo de catecolaminas, secreção *in vitro* de catecolaminas e expressão da tirosina hidroxilase (TH) na adrenal; além do 17 β -estradiol sérico materno. Análises foram realizadas pelo teste One-way ANOVA e pós-teste Newman-Keuls ($p < 0,05$). **Resultados:** As mães S apresentaram diminuição do 17 β -estradiol (vs.C -41,6%; $p=0,0186$), da SOD (vs.C -26,04%; vs.PIS -22,10%; $p=0,0025$) e aumento de CAT (vs.PIS +29,12%; $p=0,0462$). As mães PIS apresentaram redução de TBARS (vs.C -38,24%; $p=0,0462$). Aos 21 dias, as proles S e PIS apresentaram redução nos índices 1 (-22,02%; -27,36%; $p=0,0273$, respectivamente), 2 (-28,3%; -34,62%; $p=0,0014$, respectivamente) e 3 (-26,82%; -33,05%; $p=0,0273$, respectivamente); a prole S apresentou redução do TG hepático (vs.PIS -23,66%; $p=0,0313$); aumento da SOD (vs.C +10,87%; vs.PIS +9,18%; $p=0,039$), de TBARS (vs.C +127,27%, vs.PIS +143,9%; $p=0,0151$) e da GPx (vs.C +137,69%; $p=0,0125$) e GR (vs.C +33,01%; $p=0,0231$). As proles S e PIS apresentaram redução da GSSG (vs.C: -22,09%; -33,97%; $p=0,0017$, respectivamente); a prole PIS apresentou maior relação GSH/GSSG (vs.C +39,44%; vs.S +47,22%; $p=0,0053$); aumento do TG hepático vs.C (+28,95%; $p=0,0313$). Já aos 150 dias, a prole PIS apresentou, vs. C, aumento do índice 1 (+57,72%; $p=0,0082$) e 3 (+104,13%; $p=0,0082$), do colesterol hepático (+82,97%; $p=0,0322$) e da GR (+53,68%; $p=0,0231$), diminuição do TBARS (-39,82%; $p=0,0103$), menor conteúdo absoluto (vs. C: -15,82%, vs. S: -14,68%; $p=0,0436$) e relativo (vs. C: -17,96%, vs. S: -29,45%; $p=0,0081$) de catecolaminas na adrenal, devido à maior secreção quando estimulada por cafeína. A prole S mostrou diminuição dos índices 1, 2 e 3 e do colesterol hepático vs. PIS (-41,2%, $p=0,0082$; -54%, $p=0,0293$; -57,89%, $p=0,0082$; -45,76%, $p=0,0322$, respectivamente) e aumento da atividade da CAT (vs. C: +16,3%, vs. PIS: +17,55%; $p=0,0061$). **Conclusão:** O consumo materno de S na lactação programou a progênie adulta para melhores índices de aterogenicidade e maior atividade da CAT, sem alteração da função adrenal. Já o consumo de PIS programou para aumento dos índices de aterogenicidade 1 e 3, maior colesterol hepático e diminuição do conteúdo de catecolaminas na adrenal devido à maior secreção. Desta forma, é plausível que o consumo materno de S na lactação tenha efeitos cardioprotetores em longo prazo, uma vez que os parâmetros avaliados neste estudo têm estreita relação com aspectos da fisiopatologia das DCV.

ABSTRACT

Introduction: Studies have related soy consumption with beneficial effects to the organism. However, because it is rich in phytoestrogens, the safety of its consumption and its derivatives in critical phases of life has been questioned.

Objective: To evaluate the effects of dietary intake of soy or soy protein isolated during lactation on adrenal medulla function, antioxidant activity and atherogenicity indexes in lactating rats and their offspring at weaning and in adulthood.

Methods: Wistar rats with 6 male offspring were divided: Casein Control (C): casein-based diet (ptn: 16.3%, lip: 7%); Isolated soybean protein (SPI): soy protein isolated diet (ptn: 21.3%; lip: 7%); Soybean (S): soybean-based diet (ptn: 20.1%, lip: 16.8%). At weaning, 3 pups / litter received commercial feed up to 150 days. At the end of lactation (21 days) and in adulthood (150 days), was evaluated food intake (FI), body mass (BM); atherogenicity indexes 1 (CT/HDL), 2 (LDL/HDL) and 3 [(CT-HDL)/HDL], hepatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and oxidative stress biomarkers: TBARS and redox ratio (reduced glutathione / oxidized glutathione [GSH / GSSG]); absolute and relative adrenal catecholamines content, *in vitro* secretion of catecholamines as well as expression of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH); in addition to maternal serum 17 β -estradiol. Analyzes were performed by the One-way ANOVA and Newman-Keuls post-test ($p < 0.05$).

Results: S-mothers showed a decrease in 17 β -estradiol (vs.C-41.6%, $p = 0.0186$), SOD (vs. -26.04% vs. SPI-22.10%; $p = 0.0025$) and increase CAT (vs. SPI + 29.12%, $p = 0.0462$). The SPI mothers presented reduction of TBARS (vs.C -38.24%, $p = 0.0462$). At 21 days, the S and SPI offspring presented a reduction in indices 1 (-22.02%, -27.36%, $p = 0.0273$, respectively), 2 (-28.3%, -34.62%; $p = 0.0014$, respectively) and 3 (-26.82%, -33.05%, $p = 0.0273$, respectively); the S offspring presented hepatic TG reduction (vs. SPI-23.66%, $p = 0.0313$); increase SOD (vs. C + 10.87%, vs. SPI + 9.18%, $p = 0.039$), TBARS (vs.C + 127.27%, vs.SPI + 143.9%, $p = 0.0151$) and GPx (vs.C + 137.69%, $p = 0, 0125$) and GR (vs. C + 33.01%, $p = 0.0231$). The S and SPI offspring presented GSSG reduction (vs. C: -22.09%, -33.97%, $p = 0.0017$, respectively); SPI showed higher GSH / GSSG ratio (vs. C + 39.44%, vs. S + 47.22%, $p = 0.0053$); increase in hepatic TG vs. C (+ 28.95%, $p = 0.0313$). Already at 150 days, the SPI offspring presented, vs. C, increase in index 1(+ 57.72%, $p = 0.0082$) and 3 (+ 104.13%, $p = 0.0082$), of hepatic cholesterol (+ 82.97%, $p = 0.0322$) and GR (+53.68%, $p= 0.0231$), decreased TBARS (-39.82%, $p = 0.0103$), lower catecholamines absolute (vs. C: -15.82%, vs. S: -14.68%; $p= 0.0436$) and relative (vs. C: -17.96%, vs. S: -29.45%; $p=0.0081$) content in the adrenal, due to increased secretion when stimulated by caffeine. Offspring S showed a decrease in indices 1, 2 and 3 and of hepatic cholesterol vs. SPI (-41.2%, $p = 0.0082$, -54%, $p = 0.0293$, -57.89%, $p = 0.0082$, -45.76%, $p = 0.0322$, respectively) and increase CAT activity (vs. C:+16.3%, vs. PIS:+17.55%; $p=0.0061$).

Conclusion: Maternal consumption of S in lactation programmed adult progeny for better rates of atherogenicity, higher CAT activity and non-alteration of the adrenal medulla function. The consumption of SPI programmed for increase of the atherogenicity indices 1 and 3, higher hepatic cholesterol and decrease in catecholamine content in the adrenal due to increased secretion. Thus, it is plausible that the maternal consumption of S in lactation has long-term cardioprotective effects, since the parameters evaluated in this study are closely related to aspects of the pathophysiology of cardiovascular diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
AMPK - Adenosina 5' monofosfato proteína quinase
BHT - Butilhidroxitolueno
BPA – Bisfenol A
C – Controle Caseína
C/EBP - Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT
CA – Catecolaminas
CAT – Catalase
CCAAT - citosina-citosine-adenosina-adenosine-timidina
COMT – Catecol-O-metiltransferase
CT – Colesterol total
DAG – Diacilglicerol
DCV – Doenças cardiovasculares
DHD – Diidrodaidzeína
DMSO - Dimetilsulfóxido
DOPA – Dihidroxifenilalanina
DTNB - 5,5'ditio-bis (2-nitrobenzoic acid)
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
ERK1/2 – Quinase 1 e 2 reguladas por receptor extracelular
FDA – *Food and Drugs Administration*
G-6-P – Glicose-6-fosfato
GEN - Genisteína
GPx – Glutaciona peroxidase
GR - Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona oxidada
HDL-c – Colesterol HDL
HOMA-IR - Homeostatic model assessment - insulin resistance
IA – Ingestão alimentar
IP₃ – Trifosfoinositol
JAK2 - Janus quinase 2
LDL-c – Colesterol LDL
LPL – Lipoproteína lipase
LPS – Lipase-hormônio-sensível

MAO – Monoamino-oxidase
MC – Massa corporal
MDA – Malondealdeído
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mRE - Receptor de membrana do estrogênio
NA- Noradrenalina
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT - Transportador de noradrenalina
OGA - O-β-N-acetil-D-glucosaminidase
PIS – Proteína Isolada de Soja
PKA – Proteína quinase A
PM - Peso molecular
PNMT – Feniletanolamina-N-metil-transferase
PON1 – Paraoxonase
PPARs – Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
RA – Receptor adrenérgico
RE – Receptor estrogénico
S - Soja
SCAP – Proteína de ativação de clivagem
SNS – Sistema Nervoso Simpático
SOD – Superóxido dismutase
SREBP- Proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis
SULT - Sulfotransferase
TAS – Teste de estatuto antioxidante total
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Ácido tiobarbitúrico
TCA - ácido tricloroacético
TEA - Trietanolamina
TG – Triglicerídeos
TH - Tirosina Hidroxilase
TPA – 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato
UCP- Proteína desacopladora
UGT - UDP-glicuroniltransferase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	página
Figura 1: Via da biossíntese de catecolaminas.-----	22
Figura 2: Efeito das catecolaminas sobre mobilização do glicogênio hepático.-----	25
Figura 3: Efeito das catecolaminas sobre o metabolismo de glicose no fígado: glicogenólise (A) e glicogeonênese (B).-----	26
Figura 4: Efeito das catecolaminas sobre o metabolismo lipídico.-----	27
Figura 5: Integração dos sistemas de defesa enzimáticos-----	29
Figura 6: Estrutura químicas das isoflavonas da soja.-----	32
Figura 7: Mecanismo geral da ação das isoflavonas no organismo.-----	34
Figura 8: Cascata de eventos após baixa dose de daidzeína se ligando aos receptores de estrogênio de membrana (mRE) em células medulares adrenais.--	36
Figura 9: Influências do estrogênio e fitoestrogênios na síntese, secreção e reabsorção de catecolaminas em células medulares adrenais.-----	37
Figura 10: Representação esquemática do procedimento experimental-----	50
Figura 11: Esquemática do sistema utilizado para avaliação da secreção estimulada de catecolaminas em medulas adrenais isoladas de ratos.-----	59
Figura 12: Consumo de ração (A) e massa corporal (B) das mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação.-----	61
Figura 13: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenato das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação-----	62
Figura 14: Níveis de glutathiona total (A), oxidada (B), reduzida (C) e relação redox GSH/GSSG (D) em homogenato hepático das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação-----	63
Figura 15: Níveis hepáticos das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutathiona peroxidase (C) e glutathiona redutase (D) das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação-----	64
Figura 16: Conteúdo absoluto de catecolaminas na adrenal (A) e conteúdo relativo de catecolaminas pela massa da glândula adrenal (B) das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação-----	65

Figura 17: Consumo de ração (A) e massa corporal da prole durante a lactação (B) e até a vida adulta (C), cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação.----- 66

Figura 18: Níveis hepáticos de triglicerídeo (A) e colesterol total (B) das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação.----- 67

Figura 19: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenato das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação----- 68

Figura 20: Níveis de glutathiona total (A), oxidada (B), reduzida (C) e relação redox GSH/GSSG (D) em homogenato hepático das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação----- 69

Figura 21: Níveis hepáticos das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutathiona peroxidase (C) e glutathiona redutase (D) das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação.----- 70

Figura 22: Conteúdo absoluto das catecolaminas na glândula adrenal (A), conteúdo relativo das catecolaminas pela massa da adrenal (B) das proles aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação.----- 71

Figura 23: Expressão da enzima tirosina hidroxilase na adrenal da prole aos 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação.----- 72

Figura 24: Secreção basal de catecolaminas em μM (A) e ng/mg da glândula (B) na medula adrenal da prole aos 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos----- 73

Figura 25: Catecolaminas secretadas *in vitro*. Secreção estimulada por 25mM de cafeína ou 30mM de potássio ou 50mM de carbamilcolina na medula adrenal da prole aos 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação----- 73

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1: Composição das dietas dos grupos experimentais.-----	52
Tabela 2: Concentrações séricas de 17 β -estradiol das ratas lactantes C, PIS e S ao final da lactação e índices de aterogenicidade.-----	62
Tabela 3: Índices de aterogenicidade das proles C, PIS e S aos 21 dias e 150 dias de idade.-----	68
Tabela 4: Resumo dos resultados do consumo de S e PIS durante a lactação nas mães e proles aos 21 e 150 dias de idade-----	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. GLÂNDULA ADRENAL: SÍNTESE E SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS	20
2.1.1. Efeito das catecolaminas no organismo – Ênfase no metabolismo Energético	23
2.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.3. SOJA: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E FITOQUÍMICA	30
2.3.1. As isoflavonas da soja	31
2.4. SOJA: EFEITOS ENDÓCRINOS E METABÓLICOS NO ORGANISMO	34
2.4.1. Ação sobre a síntese e secreção de catecolaminas da medula adrenal	35
2.4.2. Ação sobre o metabolismo energético	38
2.4.3. Ação sobre resposta antioxidante	40
2.5. SOJA E PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	43
3. OBJETIVOS	48
3.1. OBJETIVO GERAL	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. MÉTODOLOGIA	49
4.1. CUIDADOS ÉTICOS	49
4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
4.3. RAÇÕES EXPERIMENTAIS	50
4.4. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	52
4.5. AVALIAÇÃO HORMONAL	53
4.6. ÍNDECES DE ATEROGENICIDADE	53
4.7. AVALIAÇÃO DO TRIGLICERÍDEO E COLESTEROL HEPÁTICOS	53
4.8. BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO	53
4.8.1 Peroxidação lipídica por TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)	54
4.8.2. Glutathiona total, oxidada (GSSG) e reduzida (GSH)	54
4.8.3. Atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)	55
4.8.4. Atividade da enzima Glutathiona Redutase (GR)	56
4.8.5. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	56
4.8.6. Atividade da enzima Catalase (CAT)	57

4.9. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA MEDULA ADRENAL-----	57
4.9.1. Análise <i>in vitro</i> da secreção de catecolaminas-----	58
4.9.2. Dosagem de catecolaminas totais-----	59
4.9.3. Expressão da Tirosina Hidroxilase na adrenal-----	60
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	60
5. RESULTADOS-----	61
5.1. EFEITOS DO CONSUMO DE SOJA OU PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA DURANTE A LACTAÇÃO NAS RATAS (MÃES)-----	61
5.1.1. Estado nutricional e consumo de isoflavonas-----	61
5.1.2. Concentrações séricas de 17 β-estradiol e Índices de Aterogenicidade materno-----	61
5.1.3. Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes no fígado-----	62
5.1.4. Avaliação da função adrenal-----	64
5.2. EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE SOJA OU PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA NA LACTAÇÃO NA PROGÊNIE AO DESMAME E IDADE ADULTA-----	65
5.2.1. Estado nutricional-----	65
5.2.2. Conteúdo hepático de colesterol e triglicerídeos-----	66
5.2.3. Índices de Aterogenicidade-----	67
5.2.4. Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes no fígado-----	68
5.2.5. Avaliação da função adrenal-----	71
6. DISCUSSÃO-----	75
7. CONCLUSÃO-----	87
8. REFERÊNCIAS-----	88

1 . INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max (L.) Merril*) é considerada um alimento de alto valor nutricional sendo também rica em vários fitoquímicos, tendo como destaque as isoflavonas. Estas são denominadas também de fitoestrogênios, uma vez que podem reagir com receptores estrogênicos (RE) devido sua similaridade estrutural com o 17- β estradiol (KUIPER et al., 1998; MIURA et al., 2001; KOSTELAC et al., 2003; SUCHETA et al., 2014; MELINA et al., 2016).

Os efeitos benéficos da soja têm sido atribuídos principalmente às isoflavonas e à sua proteína, que também contém isoflavonas ligadas à sua estrutura. Estudos em humanos e animais têm evidenciado que esta leguminosa apresenta ação cardioprotetora, estando enquadrada como Alimento Funcional quando seu consumo é associado à um estilo de vida saudável (FDA, 1999; BRASIL, 2005; JAVANBAKHT, 2014).

Dentre os mecanismos relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares (DCV) e redução da aterosclerose por esta leguminosa ou por seus componentes, destaca-se os seus efeitos positivos sobre o metabolismo lipídico, com redução nas concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c); sobre a resposta antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo, além de melhora na reatividade vascular (BARBOSA et al., 2006; ERBA et al., 2012; JAVANBAKHT et al., 2014). Além desses, tem sido visto melhora do perfil glicêmico, diminuição da esteatose hepática e da adiposidade corporal, as quais também podem contribuir indiretamente na prevenção dessas doenças (DAVIS, 2005; NORIEGA-LÓPEZ et al., 2007; CEDERROTH et al., 2008; SIMMEN et al., 2010; ERBA et al., 2012; JUNGBAUER e MEDJAKOVIC, 2014; MAHMOUD et al., 2014; TSE e ESLICK, 2016; JAVANBAKHT et al., 2014).

Em função desses benefícios, o consumo de soja e de suplementos com seus componentes isolados, têm sido cada vez mais frequentes. Ressalta-se que a exposição à soja e seus produtos têm ocorrido cada vez mais precocemente, já na infância. Vários produtos alimentícios consumidos por crianças contêm soja ou seus derivados em sua composição (SETCHELL et al., 2001; GENOVESE e LAJOLO, 2002; MELINA et al., 2016).

Por outro lado, tem sido questionada a segurança do consumo de alimentos que contém fitoestrógenos, especialmente em fases críticas do desenvolvimento

(gestação e lactação) uma vez que podem atuar como desreguladores de sistemas hormonais que controlam o desenvolvimento. Desta forma, podem interferir na vida adulta, afetando o futuro metabólico e hormonal da progênie (TOUSEN et al., 2006; RUHLEN et al., 2008; TROINA et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2011; JEFFERSON et al., 2012; PONTI, 2017). Esse fenômeno foi inicialmente chamado de Programação (BARKER, 1998) e, mais recentemente, ampliado para as Origens de Desenvolvimento da Saúde e da Doença, já que o ambiente perinatal pode contribuir para melhora ou piora do estado de saúde e doença dos descendentes. Portanto, a chave para uma vida saudável parece ser iniciada durante este período vulnerável (ROSENFELD, 2017).

Recentemente, estudo do nosso grupo evidenciou que o consumo materno de soja na lactação alterou o conteúdo lipídico do leite das ratas, programando a prole adulta para um fenótipo de menor risco metabólico, sendo observado redução dos níveis de colesterol total e LDL-colesterol, e também parece proteger a progênie de alterações no metabolismo glicídico apesar de maior conteúdo lipídico sérico. Já a progênie cuja mãe recebeu proteína isolada de soja (PIS) foi programada para um fenótipo considerado de risco metabólico, uma vez que apresentaram hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, além de redução na massa proteica corporal e conteúdo mineral total (VIEIRA, 2016; VIEIRA et al., 2018).

Os mediadores envolvidos nestas alterações não foram ainda determinados. Como as catecolaminas têm papel central no metabolismo lipídico e glicídico, e há estudos *in vitro* mostrando que as isoflavonas da soja, em baixas concentrações, parecem estimular a síntese desses hormônios (LIU et al., 2007), torna-se necessário avaliar a função da medula adrenal neste modelo.

Adicionalmente, já está descrito que as isoflavonas da soja têm ação antioxidante, uma vez que aumentam a atividade das enzimas glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, e diminui a peroxidação lipídica (QIAN et al., 2012; YOON e PARQUE, 2014) sendo interessante também avaliar estes parâmetros.

Ressalta-se que não temos conhecimento de estudos em modelos animais avaliando as consequências em longo prazo da exposição à soja ou à sua proteína isolada na lactação, sobre a função da medula adrenal e atividade antioxidante, os quais são parâmetros intimamente relacionados com a proteção cardiovascular, e

que podem estar relacionados com algumas alterações observadas anteriormente neste modelo.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do consumo de uma dieta a base de soja e de uma dieta a base de proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação sobre a função da medula adrenal, atividade antioxidante e índices de aterogenicidade em ratas lactantes e suas proles ao desmame e na idade adulta. Acreditamos que conhecer os efeitos da exposição à soja e de sua proteína em fases críticas da vida pode ser importante para otimizar a promoção à saúde e prevenir doenças cardiovasculares na vida adulta da prole.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. GLÂNDULA ADRENAL: SÍNTESE E SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS

As glândulas adrenais possuem dois tecidos diferentes quanto à histologia, bioquímica e características funcionais. Esses tecidos são a medula adrenal - localizada centralmente, responsável pela secreção das catecolaminas - e o córtex adrenal - na periferia, responsável por produzir hormônios esteróides. Ambos os tecidos estão envolvidos em diferentes aspectos do metabolismo através de hormônios. (DOUGLAS, 2006).

A medula adrenal é derivada de células ganglionares simpáticas da crista neural e tem capacidade de sintetizar as catecolaminas, que são substâncias com um núcleo catecol (benzênico com duas hidroxilas) e uma amina (NH_2) na cadeia lateral. As principais são a adrenalina, a noradrenalina e a dopamina (DOUGLAS, 2006).

A medula adrenal é innervada por neurônios simpáticos pré-ganglionares colinérgicos. Ela é composta quase inteiramente de células cromafins, responsáveis por secretar noradrenalina e adrenalina (NONOGAKI, 2000; SILVA, 2005; LI, 2015).

A biossíntese das catecolaminas (Figura 1) se inicia com o aminoácido tirosina, que sofre ação da enzima tirosina hidroxilase (TH) e é convertido em DOPA (diidroxifenilalanina), onde entra em ação a dopa-descarboxilase, transformando em dopamina (diidroxifenilalanina). Para a formação da noradrenalina ocorre ação da dopamina- β -hidroxilase. Para a formação de adrenalina, entra também em ação a enzima feniletanolamina-N-metil-transferase (PNMT), que acrescenta uma metila à amina da cadeia lateral da noradrenalina. A secreção de adrenalina e noradrenalina é feita por células diferentes. As células que possuem PNMT secretam a adrenalina e aquelas sem PNMT secretam noradrenalina (SILVA, 2005; DOUGLAS, 2006; TEKIN et al, 2014; VERBERNE et al., 2016).

A medula adrenal e o sistema nervoso simpático (SNS) possuem a mesma origem embrionária, portanto apresentam diversas características em comum (LOURENÇO e FORTUNATO, 2005). Os neurônios simpáticos da medula espinhal comunicam-se com os neurônios simpáticos periféricos através de gânglios simpáticos - aglomerado de corpos celulares - por sinapses químicas. Por conseguinte, os neurônios simpáticos da medula são chamados neurônios pré-

sinápticos ou pré-ganglionares, e neurónios simpáticos periféricos são denominados de neurónios pós-sinápticos ou pós-ganglionares. Nas sinapses dentro dos gânglios simpáticos, os neurónios simpáticos pré-ganglionares libertam acetilcolina (ACh), que ativam os receptores nicotínicos resultando na entrada de Ca^{2+} por canais sensíveis à voltagem - os subtipos de canal de cálcio podem exibir diferentes ações no controle da secreção - ou por mecanismos independentes da despolarização da membrana plasmática (GARCIA et al., 2006; MORENO, 2016).

As células cromafins da medula adrenal expressam diversos subtipos de canais de cálcio (T, L, N, P/Q, R), que são classificadas de acordo com sua amplitude de ativação, e dependendo do tipo de canal, pode-se gerar maior favorecimento da secreção. Estes variam de acordo com cada espécie, padrão de estimulação e tipo celular (noroadrenérgico ou adrenérgico). Assim, a secreção de catecolaminas é controlada de forma diferente, de acordo com os canais de cálcio expressos pelas células (GARCIA et al., 2006).

Em relação aos mecanismos independentes, sabe-se que quando as catecolaminas (neurotransmissores) se ligam aos receptores adrenérgicos do tipo α_1 , a proteína G ativa a enzima fosfolipase C (PLC), gerando a quebra dos fosfolipídios de membrana, formando trifosfoinositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 abre os canais de cálcio no retículo endoplasmático, promovendo liberação do Ca^{2+} para o citoplasma. Assim, as catecolaminas são secretadas pelas células cromafins e podem exercer suas funções nos órgãos-alvo. Entretanto, esse mecanismo ocorre em menor grau (NELSON e COX, 2011).

Independente da maneira, o aumento no Ca^{2+} citosólico é fundamental para a liberação de catecolamina pelas células cromafins (WAKADE, 1981; DOUGLAS, 2006; ORBAN et al, 2015).

As catecolaminas são fundamentais no preparo do organismo para um período de atividade imediata e intensa, preparando-o para sobrevivência em momentos de “luta ou fuga” ou durante hipoglicemia grave, hemorragia, infarto agudo do miocárdio ou outros conflitos estressantes. Entre outras adaptações, as catecolaminas promovem: ativação do estado geral de vigília, aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da força de contração do miocárdio, do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, da dilatação de pupilas e bronquíolos e da mobilização da glicose para a corrente sanguínea, diminuição do peristaltismo,

inibição do reflexo de micção, lipólise e sudorese (MOURÃO JR e ABRANMOV, 2011; DIEGO et al., 2008; GARCIA et al., 2006).

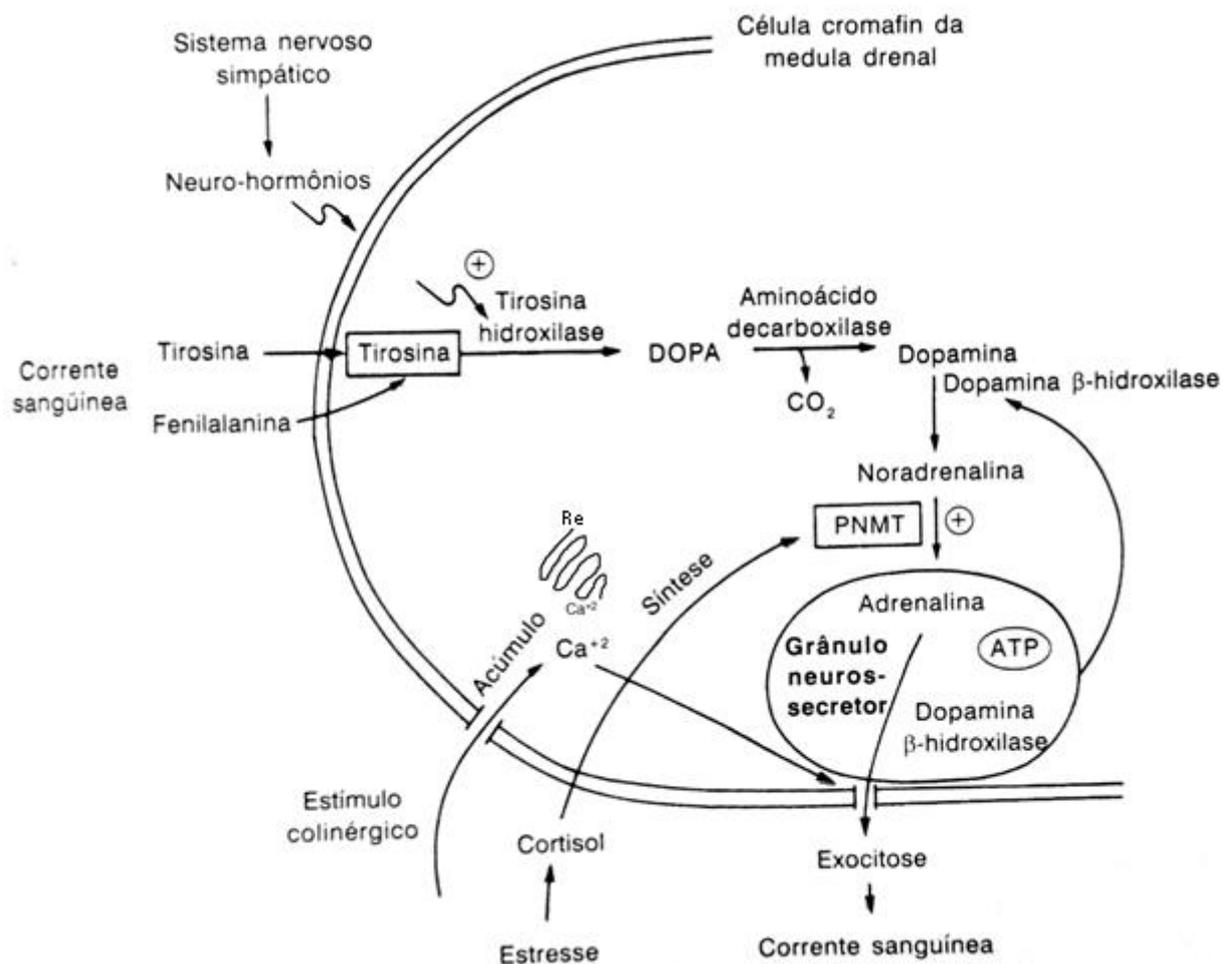


Figura 1: Via da biossíntese de catecolaminas. Re: Retículo endoplasmático. Ca^{+2} : Cálcio. Fonte: Adaptado de Poian e Carvalho-Alves (2005).

Entretanto, a concentração de catecolaminas deve ser controlada e apropriada para os órgãos que precisam se adaptar ao estresse mental ou físico, assim é necessário um controle preciso e eficiente de sua secreção. Um aumento descontrolado da secreção de catecolaminas pode gerar crise hipertensiva, arritmias e danos no miocárdio (GARCIA et al., 2006).

Segundo Diego et al (2008) para manter os níveis circulantes de catecolaminas, em condições basais, suficientes para manter a pressão arterial normal e a homeostase cardiovascular, a medula adrenal secreta cerca de $0,2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ de adrenalina e cerca de $0,05 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ de noradrenalina por

impulsos nervosos a cada poucos segundos. Os órgãos são estimulados por duas maneiras: diretamente pelos nervos simpáticos e indiretamente pelos hormônios medulares adrenais. Estes mecanismos oferecem segurança, pois um pode ser substituído pelo outro em situações de falta. Sob a situação necessárias, é produzida uma descarga em massa de grandes porções do sistema nervoso simpático e da medula adrenal, levando à uma secreção maior de catecolaminas.

A resposta do SNS ocorre através de neurotransmissores catecolaminérgicos, e da glândula adrenal por hormônios com a finalidade de alcançar todos os órgãos alvos, via corrente sanguínea (LOURENÇO e FORTUNATO, 2005; MOURÃO JR e ABRANMOV, 2011).

Já foi mostrado que a síntese de CA induzida pela ACh está associada com a ativação da TH nas células adrenais bovinas (LI et al., 2015) e que a TH é regulada por duas formas diferentes: regulação de médio a longo prazo da expressão gênica e regulação a curto prazo da atividade enzimática (KUMER e VRANA, 1996). A ativação de TH pela fosforilação é o principal mecanismo responsável pela manutenção dos níveis de CA nos tecidos. A TH é regulada de forma aguda pela sua fosforilação em Ser8, Ser19, Ser31 e Ser40 através de uma variedade de proteínas quinases (CAMPBELL et al., 1986; DUNKLEY et al., 2004; TEKIN et al., 2014).

A catecolamina mais presente no sangue é a adrenalina devido à maioria das células encontradas na medula adrenal serem cromafins com PNMT (NONOGAKI, 2000; SILVA, 2005; HOOK et al., 2015), entretanto sua meia vida é curta devido à rápida destruição ou eliminação pela urina, deixando assim os níveis sanguíneos de catecolaminas baixos (ng/ml). As enzimas responsáveis por sua degradação, que ocorre principalmente no fígado e no rim, são a COMT (catecol-O-metiltransferase) que age metilando-as e a MAO (monoamino-oxidase), que age oxidando-as, terminando assim o metabolismo das catecolaminas (SILVA, 2005).

2.1.1. Efeito das catecolaminas no organismo – Ênfase no metabolismo energético

As catecolaminas exercem seus efeitos via receptores celulares, denominados α e β receptores adrenérgicos (RA), que estão presentes em diversos

tecidos. Os receptores adrenérgicos são acoplados à proteína G transmembranar e medeiam os efeitos das catecolaminas (noradrenalina, adrenalina). A adrenalina e noradrenalina apresentam afinidades distintas com os receptores, portanto, as diferenças nas ações das catecolaminas podem ser explicadas pela existência de receptores distintos nos tecidos (SHI et al., 2016; VERBERNE et al., 2016; MORALES-CANÉ et al., 2016).

A estimulação de receptores adrenérgicos por catecolaminas regula diversos processos fisiológicos, incluindo a taxa de batimento cardíaco e sua força de contração, tônus de músculo liso vascular e brônquico, metabolismo energético e atividades neuronais centrais (XIAO, 2006).

As catecolaminas desempenham papel importante na regulação do metabolismo energético, em especial sobre o metabolismo glicídico e de lipídeos, sendo que cada tecido tem uma resposta específica a essa regulação. De modo geral, estimulam a lipólise, cetogênese, termogênese, glicólise muscular, além de aumentar a produção de glicose no fígado a partir da ativação da glicogenólise e da gliconeogênese (NONOGAKI, 2000).

No fígado a adrenalina se liga a β -RA e ativa a adenilato-ciclase, enzima responsável por gerar AMPc (adenosina monofosfato cíclico). O aumento deste torna ativa a PKA (proteína quinase A), ativando a enzima glicogênio-fosforilase, enzima envolvida nas vias gliconeogênese e glicogenólise. Também atua sobre α -RA e inibe a enzima glicogênio-sintase, diminuindo a síntese de glicogênio (NONOGAKI, 2000; NELSON e COX, 2011; BERG, 2012) (Figura 2). Desta forma, a adrenalina é um importante contribuinte para a produção de glicose hepática no estado de jejum.

A gliconeogênese hepática responde à concentração de noradrenalina, que está relacionado com o aumento de lactato e glicerol, percussores da gliconeogênese, liberados pelos tecidos periféricos (NONOGAKI, 2000; BERG, 2012).

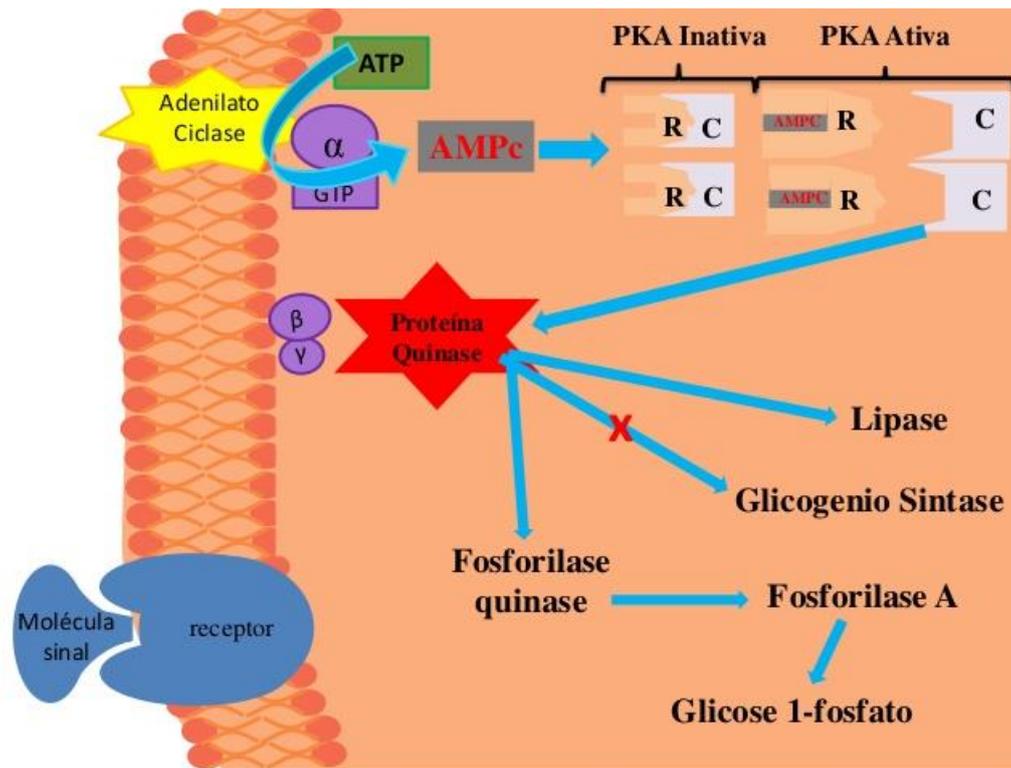


Figura 2: Efeito das catecolaminas sobre mobilização do glicogênio hepático. Fonte: Ferreira, et al. (2015).

Tanto em humanos como em roedores, a produção de glicose hepática no estado basal é controlada através da inibição pela insulina e estimulação por vários fatores contra-reguladores, incluindo catecolaminas liberadas pelo SNS e medula adrenal. A adrenalina tem efeito na inibição da secreção de insulina nas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas e estimula a secreção de glucagon nas células α (Figura 3) (NONOGAKI, 2000, DOUGLAS, 2006).

Contudo, estudos mostram que as catecolaminas prejudicam a tolerância à glicose por inibição da secreção de insulina (SHI, et al., 2016) ou por resistência à insulina (GRASSI et al., 2010), aumentando a produção de glicose hepática através de estimulação tanto da gliconeogênese como da glicogenólise, como elucidado acima (NONOGAKI, 2000; SHI et al., 2016). Assim, a adrenalina é susceptível de mascarar a secreção de insulina e suas ações, levando a hiperglicemia aguda (NONOGAKI, 2000).

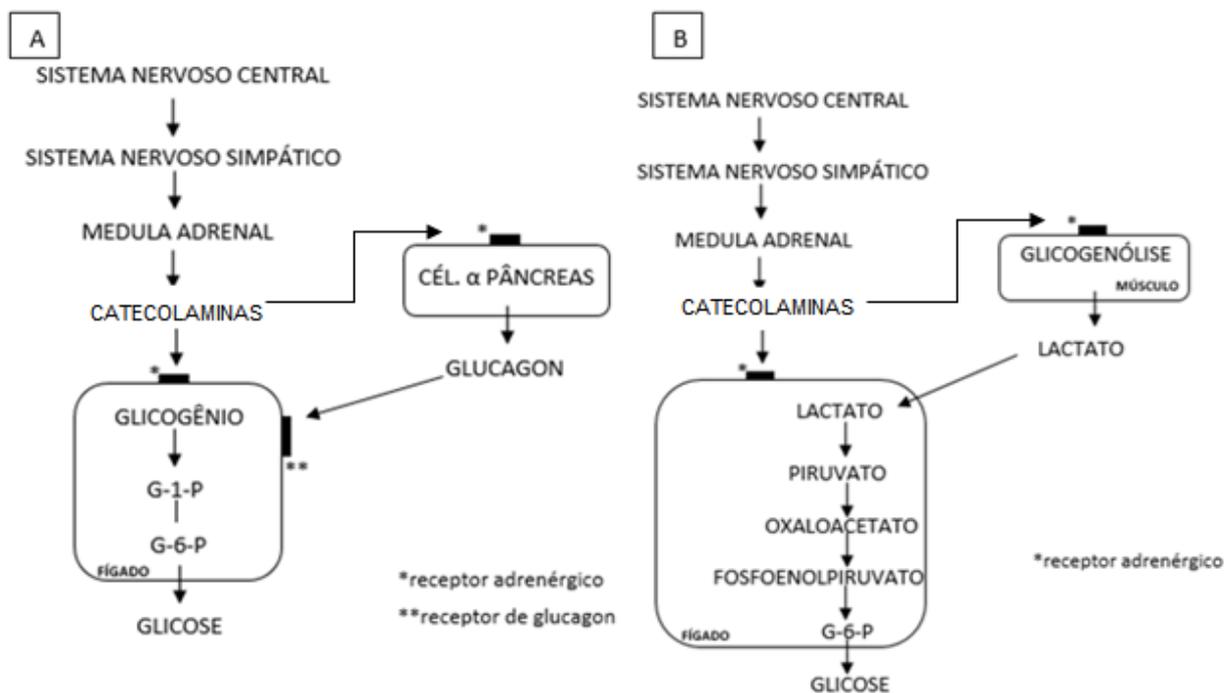


Figura 3: Efeito das catecolaminas sobre o metabolismo de glicose no fígado: glicogenólise (A) e gliconeogênese (B). G-1-P: glicose-1-fosfato/ G-6-P: glicose-6-fosfato. Fonte: Adaptado Nonogaki (2000).

No tecido adiposo a adrenalina estimula a lipólise via β -RA, seguido pela ativação da adenilato-ciclase e aumento de AMPc, que promove a fosforilação da lipase-hormônio-sensível (LPS), ativando-a (Figura 4) (NONOGAKI, 2000; DOUGLAS, 2006). Entretanto, quando se ligam no α -RA, as catecolaminas inibem a lipólise (BOYDA et al., 2013).

Como consequência a ação das catecolaminas no tecido adiposo ocorre a liberação de glicerol e ácidos graxos na corrente sanguínea, bem como diminuição da biossíntese destes. Além disso, as catecolaminas atuam na termogênese, ativando as UCPs (proteínas desacopladoras) (Figura 4). A UCP-1, presente do tecido adiposo marrom, acelera o retorno de prótons para a matriz mitocondrial, fazendo com que a maior parte da energia proveniente do ciclo de Krebs e, por conseguinte, da oxidação dos substratos energéticos, seja perdida na forma de calor (BIANCO, 2000).

Outro efeito da adrenalina está relacionado com a atuação da lipoproteína lipase (LPL), enzima vinculada ao metabolismo de lipoproteínas. Esta catecolamina aumenta a atividade desta enzima no músculo gerando assim um aumento na

Quando a produção de EROs supera a capacidade de ação dos antioxidantes, pode levar à oxidação de biomoléculas como de lipídeos, proteínas, ácido desoxirribonucléico (DNA) e gerar disfunção endotelial. Essas alterações podem impedir funções importantes como propriedades vasorrelaxantes, anticoagulantes e anti-inflamatórias, que estão associadas à DCV (ENDERMAN e SCHIFRIN, 2004; WIDLANSKY et al, 2003). Um aumento no estresse oxidativo parece contribuir para o desencadeamento de mecanismos relacionados com o desenvolvimento de doenças crônicas. Portanto, deve ser controlado, evitando que os danos causados por radicais livres sejam amplificados (BARBOSA, 2006; AZZI, 2007, YOON e PARQUE, 2014).

As principais EROs são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot), que apresentam um elétron desemparelhado em sua molécula (SIES e STAHL, 1995; HALLIWELL, 1992). Os antioxidantes são definidos como substâncias capazes de atrasar ou inibir a oxidação de maneira eficaz que podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaís, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos, portanto, o sistema de defesa antioxidante é composto de elementos enzimáticos e não-enzimáticos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

O sistema de defesa enzimático (Figura 5) inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR). A SOD atua na conversão do O_2^- - que é gerado na mitocôndria através da cadeia respiratória e pelas enzimas NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) - em H_2O_2 que é difundido pela membrana mitocondrial e sofre ação da CAT (peroxissomos) ou GPx (mitocôndria) (NAUDI et al., 2011). A CAT é responsável pela transformação do H_2O_2 em água e oxigênio. A glutaciona está presente no organismo de duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSH). A glutaciona na forma reduzida, ao sofrer ação da GPx a fim de eliminar o H_2O_2 , se converte para seu estado oxidado ao doar hidrogênio. Assim, torna-se necessário a presença de outra enzima para regeneração da glutaciona reduzida, que é a glutaciona redutase a qual utiliza o NADPH como cofator, objetivando contínuo ciclo metabólico da glutaciona (JOHANSEN et al., 2005).

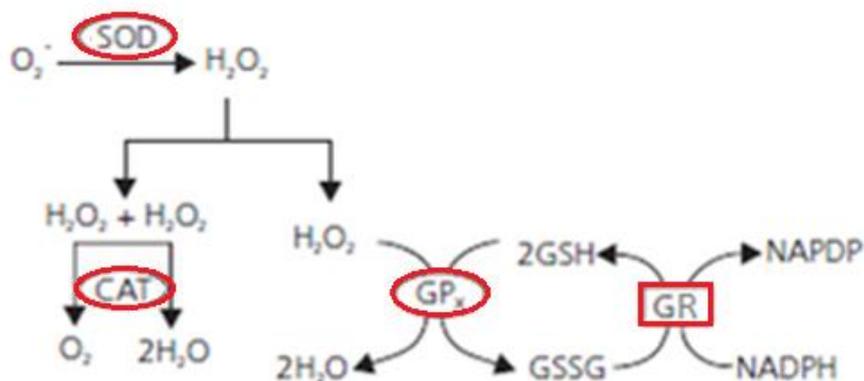


Figura 5: Integração dos sistemas de defesa enzimáticos. SOD: Superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; GSH: Glutatona reduzida; GSSG: Glutatona oxidada. Fonte: Adaptado de Barbosa, et al (2011).

Além dos componentes enzimáticos que atuam na resposta antioxidante, há os componentes antioxidantes não enzimáticos, encontrados principalmente em alimentos *in natura*. Dentre estes, os principais elucidados na literatura incluem algumas vitaminas - C, E e A - e alguns compostos bioativos - carotenoides, flavonóides, outros polifenóis (OLIVEIRA et al., 2009). Os flavonoides (isoflavonas) presentes na soja têm sido destacados como importantes agentes naturais antioxidantes.

Estudos mostram que a eficiência da atividade antioxidante dos compostos bioativos de alimentos é influenciada por diversos fatores: genéticos, condições ambientais, grau de maturação e variedade da planta, pelo substrato, solvente e técnica de extração utilizada, pelo binômio tempo-temperatura, da estrutura química, do posicionamento dos grupos substituintes, do grau de hidroxilação e de sua concentração no alimento (HU et al, 1995; VINSON et al., 2001; LOTITO e FREI, 2004; FURUSAWA et al., 2005; MOREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Apesar de alguns estudos ressaltarem o uso de nutrientes isolados como antioxidantes, sabe-se que os alimentos detêm uma diversidade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção celular e tecidual contra danos provenientes das EROs. Assim, o consumo integral dos alimentos ricos em nutrientes e compostos antioxidantes, parece ser a primeira escolha para reforçar as defesas antioxidantes do organismo (NIKI et al., 1995; HERCBERG et al., 1998). Desta forma, é de fundamental interesse o desenvolvimento de estudos que avaliem

o impacto do consumo de alimentos sobre a defesa antioxidante em diversas fases da vida, em especial nas fases de desenvolvimento.

2.3. SOJA: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E FITOQUÍMICA

De acordo com o Ministério da Agricultura, a soja é cultivada principalmente nas regiões Centro Oeste e Sul do país e se destaca na agricultura pela sua crescente produtividade no Brasil, que já ocupa a segunda posição no ranque entre os maiores produtores do mundo (EMBRAPA, 2017). Além de estar presente na fabricação de rações animais, a soja e seus derivados são cada vez mais frequentes na alimentação humana, especialmente como constituinte de alimentos processados, sendo estimado que 60% desses alimentos possuem soja em sua composição (SETCHELL et al., 2001; GENOVESE e LAJOLO, 2002; BRASIL, 2017; PONTI, 2017).

A soja apresenta elevado teor de gorduras (20%), e proteínas (40%) comparada as demais leguminosas cozidas como os feijões, lentilhas e ervilhas, que apresentam em média 5% de proteína e 0,5% de gordura (TACO, 2011). A proteína presente na soja é considerada de alta qualidade devido ao perfil de aminoácidos e digestibilidade, sendo rica em lisina, o que é importante para completar a deficiência de lisina dos cereais, e limitada em metionina, assim como as demais leguminosas (HUGHES et al, 2011; SUCHETA et al., 2014; RUTHERFURD et al., 2015).

Em relação ao carboidrato, os grãos de soja são constituídos principalmente pelo oligossacarídeo estaquiose, que por não ser completamente digerido pelos seres humanos, estimula o crescimento de bifidobactérias, podendo, assim, ser considerado um prébiótico e um bom alimento para diabéticos, pois ajuda no controle da glicemia (KARR-LILIENTHAL et al., 2005). Já o teor de lipídeos é composto por aproximadamente 10% a 15% de ácidos graxos saturados, 19% a 41% monoinsaturados e 46% a 62% de ácidos graxos poli-insaturados, sendo considerado um alimento fonte de ácidos graxos essenciais (SUCHETA et al., 2014; MELINA et al., 2016). Variações nos teores de nutrientes estão relacionadas à diversos fatores como época do ano, tipo de plantio, solo, região, clima, entre outros. A soja é boa fonte também de ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre, fósforo, manganês e vitaminas do complexo B (SUCHETA et al., 2014).

Esta leguminosa além de seu alto valor nutricional possui em sua composição diversos compostos fitoquímicos como: isoflavonas, saponinas¹, compostos fenólicos², inibidores de proteases³, fitatos⁴ e fitosteróis⁵. Estudos mostram que alguns desses compostos, principalmente as isoflavonas, atuam na redução dos riscos de diversas doenças crônicas e degenerativas (TSE e ESLICK, 2016; MELINA et al., 2016). A FDA (*Food and Drugs Administration*) oficializou a soja, em 1999, como alimento com potencial terapêutico na prevenção de doenças do coração, enquadrando-a como um Alimento Funcional (EMBRAPA, 2017). No Brasil, em 2005, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) reportou que o consumo diário de 25g de proteína de soja é capaz de proteger contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BRASIL, 2005). É importante salientar que ambas as instituições fazem associação do eu consumo com um “estilo de vida saudável” para promoção da cardioproteção.

2.3.1. As isoflavonas da soja

A soja é uma fonte alimentar de isoflavonas, sendo vários dos efeitos benéficos da soja atribuídos a estes flavonóides. Suas isoflavonas predominantes são a genistina, a daidzina e a glicitina - 50%, 40% e 10% do conteúdo total de isoflavona de soja, respectivamente -, encontradas na forma glicídica, ou seja, ligada a uma molécula de glicose. Após a ingestão, as isoflavonas da soja sofrem hidrólise pelas enzimas β -glicosidases, que são produzidas no intestino delgado e pela microbiota intestinal, liberando as formas agliconas, que são as substâncias bioativas: genisteína, daidzeína e gliciteína (Figura 6) (CAVALLINI e ROSS, 2009; BARNES, 2010; JARRELL et al., 2012; MAHMOUD et al. 2014; MELINA et al., 2016).

As agliconas são absorvidas a partir do intestino delgado. Após sua absorção no trato gastrointestinal, as isoflavonas são conjugadas com ácido glicurônico ou ácido sulfúrico, em reação catalisada pela UDP-glicuroniltransferase (UGT) ou pela

¹ Glicosídeos do metabolismo secundário vegetal, caracterizado pela formação de espuma, tendo propriedade detergente e surfactantes. Reduz colesterol, anti-inflamatória e antivirais.

² Antioxidantes que combatem o envelhecimento celular.

³ Capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas. Função inseticida.

⁴ Na planta é utilizado para armazenar fósforo. É quelante de alguns minerais.

⁵ Esteróis presentes nas plantas. Competem com o colesterol da dieta, reduzindo sua absorção.

sulfotransferase (SULT), podendo ocorrer no epitélio intestinal ou no fígado (RIMBACH et al., 2004; BARNES, 2010).

No lumén, a genisteína é convertida a p-etilfenol e 4-hidroxi-fenil-2-ácido propiônico. Já a daidzeína é hidrogenada, dando origem à diidrodaidzeína (DHD), que é transformada em O-desmetilangolensina (O-DMA) ou equol (CAVALLINI e ROSS, 2009). O equol é formado pela ação de bactérias específicas da região distal do intestino e cólon, mas não é produzida por todos os seres humanos que consomem a soja, pois são necessárias ótimas condições no trato gastrointestinal para as reações de redução e desoxigenação transformarem a daidzeína em equol (BROWN et al., 2014). Estudos mostram que indivíduos que incluem alimentos à base de soja em sua dieta rotineiramente apresentam maior probabilidade de produzi-lo (YUAN, 2007).

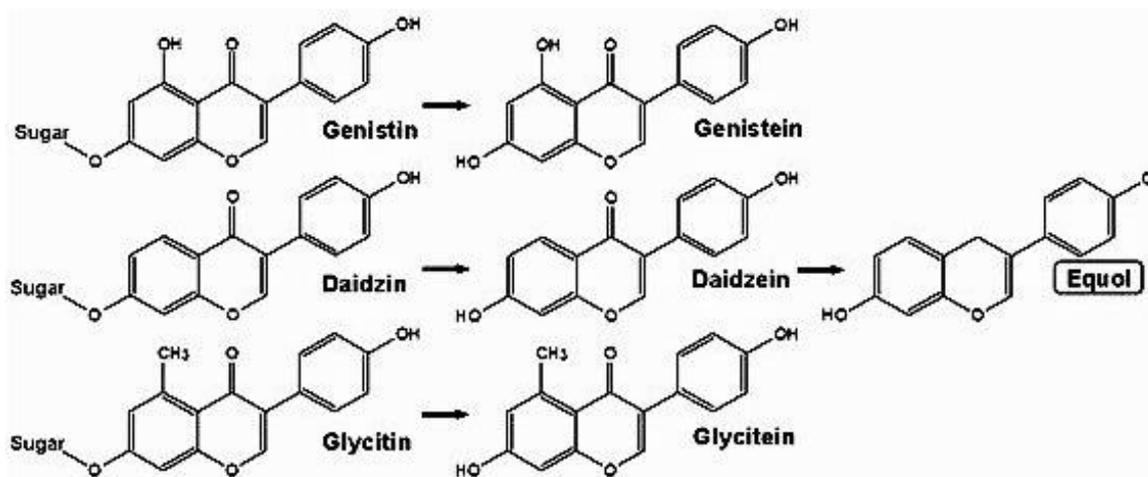


Figura 6: Estrutura química das isoflavonas da soja. Isoflavonas na forma glicídica: genistina, daidzina e glicitina; como substâncias bioativas: genisteína, daidzeína, gliciteína e equol. Fonte: Mendes (2015).

As isoflavonas absorvidas são agrupadas aos quilomicrons e distribuídas aos tecidos, atingindo concentrações séricas máximas entre 2 e 8 horas após a ingestão da soja. Sua ação ocorre em todas as células que contêm receptores para estrógenos (SETCHELL et al., 2003).

O metabolismo das isoflavonas pode sofrer alterações dependendo da microbiota intestinal, da idade que foi ofertada (BROWN et al., 2014), da quantidade de hidratos de carbono (MAHMOUD, et al. 2014), proteínas (VITALE et al., 2013) e fibra alimentar da dieta (TEEKACHUNHATEAN et al., 2012) da persistência da

lactase (YUAN, 2007), do processamento da soja (ALLRED et al., 2005) e formulações utilizadas - soja, leite de soja, isoflavona pura - (VITALE et al., 2013), o que determina sua biodisponibilidade e variabilidade interpessoal (CHANDRASEKHARAN e AGLIN, 2013).

As isoflavonas apresentam semelhança à estrutura do estradiol. Devido a essa semelhança, as isoflavonas podem ligar-se aos receptores α e β do estrogênio (α e β -RE) (JEFFERSON, 2012; LI et al., 2013; PONTI, 2017). No entanto, em comparação com estrogênios fisiológicos, tais como 17 β -estradiol, as isoflavonas têm menor afinidade aos receptores celulares (BARNES, 2010; MAHMOUD et al., 2014). Contudo, estudos mostram que essa ligação de baixa afinidade já é suficiente para as isoflavonas exercerem seus efeitos nos tecidos-alvo, e, inclusive, atravessar a barreira placentária e hematoencefálica (DOERGE et al., 2001; GU et al., 2005). Ressalta-se, que as isoflavonas podem agir como agonistas ou antagonistas estrogênicos dependendo da dose utilizada e do tecido alvo (KOSTELAC et al., 2003).

Os agonistas de α -RE geralmente causam proliferação celular enquanto os agonistas de β -RE causam a parada do ciclo celular e apoptose (ASCENZI et al., 2006; HELDRING et al., 2007). Portanto, os fatores que modificam a farmacocinética (absorção, distribuição, disposição, metabolismo e eliminação) das isoflavonas orais são importantes na manutenção do equilíbrio entre os efeitos benéficos e adversos das isoflavonas (CHANDRASEKHARAN e AGLIN, 2013).

Foi evidenciado que os efeitos dos estrogênios nas células normalmente são iniciados pela ativação clássica aos seus receptores que pertencem à superfamília de receptores de esteróides nucleares (α e β -RE), atuando como fatores de transcrição, denominado efeito genômico (KUMAR et al., 2011). A distribuição nos tecidos e as afinidades relativas de ligação de α -RE e β -RE diferem, o que pode ajudar a explicar a ação seletiva dos estrogênios em diferentes tecidos (VITALE et al., 2013).

Entretanto, estudos mostram que também ocorrem mecanismos não-clássicos (não genômicos) de ação nos RE, provavelmente em receptores extracelulares ligados à membrana, como, por exemplo, o receptor de estrogênio acoplado a proteína G (FILARDO et al. 2007; MADEO e MAGGIOLINI, 2010; TOYOHIRA et al., 2010). Foi observado que, através deste receptor, o estrogênio ativa diversas vias de sinalização, como a estimulação da adenilil-ciclase - envolvida

no metabolismo energético -, de proteínas quinase e mobilização de cálcio intracelular - relacionado à secreção de catecolaminas (SOLTYSIK e CZEKAJ, 2013). Desta forma, as isoflavonas podem agir por mecanismos genômico e não genômico no organismo para causar seus desfechos (Figura 7).



Figura 7: Mecanismo geral da ação das isoflavonas no organismo. Fonte: Adaptado de Esteves e Monteiro (2001).

2.4. SOJA: EFEITOS ENDRÓCRINO E METABÓLICO NO ORGANISMO

Vários efeitos metabólicos têm sido evidenciados com o consumo de soja ou seus componentes isolados. Embora não haja consenso entre os autores, os benefícios desta leguminosa têm sido atribuídos principalmente às isoflavonas e à PIS, que também contém isoflavonas ligadas à sua estrutura (LIU et al., 2007; PFAEHLER et al., 2012).

Estudos em humanos e animais mostram que há redução do colesterol total, colesterol LDL-c e triglicerídeos (WEGGEMANS e TRAUTWEIN, 2003; DAVIS, 2005; SIMMEN et al., 2010; CHI et al., 2016; YAN et al., 2017), além de redução do estresse oxidativo, exercendo efeito protetor contra doenças cardiovasculares (VEGA-LOPEZ, 2005; HEMENAN et al., 2007; SANTANA et al., 2008; ERBA, 2012;

JAVANBAKHT, 2014). Tem sido demonstrado também, que as isoflavonas da soja, podem apresentar propriedades anti-tumorais em diferentes linhagens celulares, reduzindo cânceres hormônio dependentes e a reabsorção óssea (LAMARTINIERE et al., 2002; NAGATA et al., 2006; TAYLOR et al., 2009; MAHMOUD et al., 2014; TSE e ESLICK, 2016). Também já foi observada redução da insulinemia e da resistência à insulina, diminuição da esteatose hepática, da adiposidade e do peso corporal (BHATHENA e VELASQUEZ, 2002; NORIEGA-LÓPEZ et al., 2007; VELASQUEZ et al., 2007; CEDERROTH et al., 2007; CEDERROTH et al., 2008; SIMMEN et al., 2010; JUNGBAUER e MEDJAKOVIC, 2014).

2.4.1. Ação sobre a síntese e secreção de catecolaminas da medula adrenal

Não há estudos em modelos animais avaliando os efeitos do consumo de soja sobre a função da medula adrenal, sendo encontrados apenas poucos estudos realizados *in vitro* sobre o efeito das isoflavonas isoladas na síntese e secreção de catecolaminas.

Liu et al (2007) demonstraram, *in vitro*, que a daidzeína em concentrações séricas humanas estimula a síntese de catecolaminas através de receptores de estrogênio de membrana plasmática, mas em altas concentrações inibe a síntese de catecolaminas e a secreção induzida por acetilcolina na medula adrenal bovina.

Adicionalmente, Yanagihara et al (2008) também realizaram experimentação *in vitro* utilizando células da medula adrenal de bovinos com estimulação de hormônio estrogênico e daidzeína da soja. A incubação das células com o 17 β -estradiol (na concentração de 10-100 nM) ou com daidzeína (na concentração de 0,01-1,0 μ M) estimulou significativamente a síntese e secreção de catecolaminas. Entretanto, em concentrações elevadas (1, 10 e 100 μ M) a daidzeína reduziu expressivamente a secreção de catecolaminas induzida pela acetilcolina. Uma explicação sugerida seria que a daidzeína em altas concentrações possam interagir com canais iônicos por alteração das propriedades da membrana das células medulares adrenais (YANAGIHARA et al., 2008).

Além disso, o efeito estimulador observado não foi inibido por ICI182,780 - um inibidor do receptor do estrogênio clássico - mas aboliu por U0126 - um inibidor de receptor de membrana (ERK1/2) - e por H-89 - um inibidor da proteína quinase

A (PKA) -, o que resultou em eliminar o efeito estimulador da daidzeína em células da medula adrenal (LIU et al., 2007 ; YANAGIHARA et al., 2008).

Diante do exposto, é sugerido que a daidzeína em baixas concentrações parece estimular a síntese de catecolaminas, provavelmente via ativação da enzima TH. O mecanismo proposto seria a ligação da isoflavona a receptores de estrogênio na membrana, com consequente ativação das vias ERK1/2 e/ou PKA 1, com consequente ativação da TH (Figura 8). Por outro lado, em altas concentrações, a daidzeína parece inibir a síntese e secreção de catecolaminas induzida por acetilcolina (LIU et al. 2007; YANAGIHARA et al., 2008).

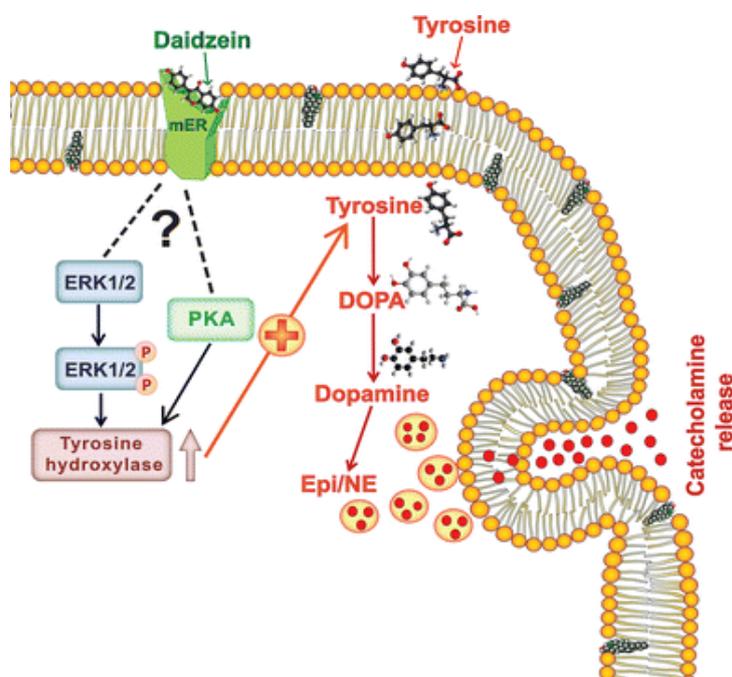


Figura 8: Cascata de eventos após baixa dose de daidzeína se ligando aos receptores de estrogênio de membrana (mRE) em células medulares adrenais. *ERK1/2*: quinase 1 e 2 reguladas por receptor extracelular, *PKA*: proteína quinase A, *DOPA*: L-3,4-diidroxifenilalanina, *Epi/NE*: Epinefrina (adrenalina) / norepinefrina (noradrenalina). Fonte: Ajdzanovic (2015).

Tem sido evidenciado também efeito das isoflavonas sobre as catecolaminas provenientes do SNS, conforme descrito por Toyohira et al. (2010). Estes autores a partir de testes *in vitro*, com células de neuroblastoma (SK-N-SH) e células COS-7⁶ transfectadas com transportadores de noradrenalina (NAT),

⁶ Trata-se de uma linha celular semelhante a fibroblastos de rim de macaco adequada para transfecção (Processo industrial de introdução intencional de ácidos nucleicos nas células) (BCRJ, 2017).

sugeriram que a genisteína, em concentração que se sobrepõe parcialmente às encontradas no plasma de indivíduos humanos aumenta a atividade de NAT na membrana da superfície celular. Esse transportador (NAT) é uma proteína de membrana plasmática que regula a transmissão sináptica noradrenérgica por reabsorção de noradrenalina (NA) na sinapse. Portanto, a genisteína aumenta a reabsorção de NA e reduz a sua concentração em neurônios simpáticos, limitando assim a resposta pós-sináptica. (TOYOHIRA et al., 2010). Desta forma, é possível que a genisteína influencie a transmissão neuronal de NA através de regulação positiva das atividades do NAT.

A figura 9 resume os mecanismos de ação do estrogênio e fitoestrogênicos na síntese, secreção e reabsorção de catecolaminas em células medulares adrenais.

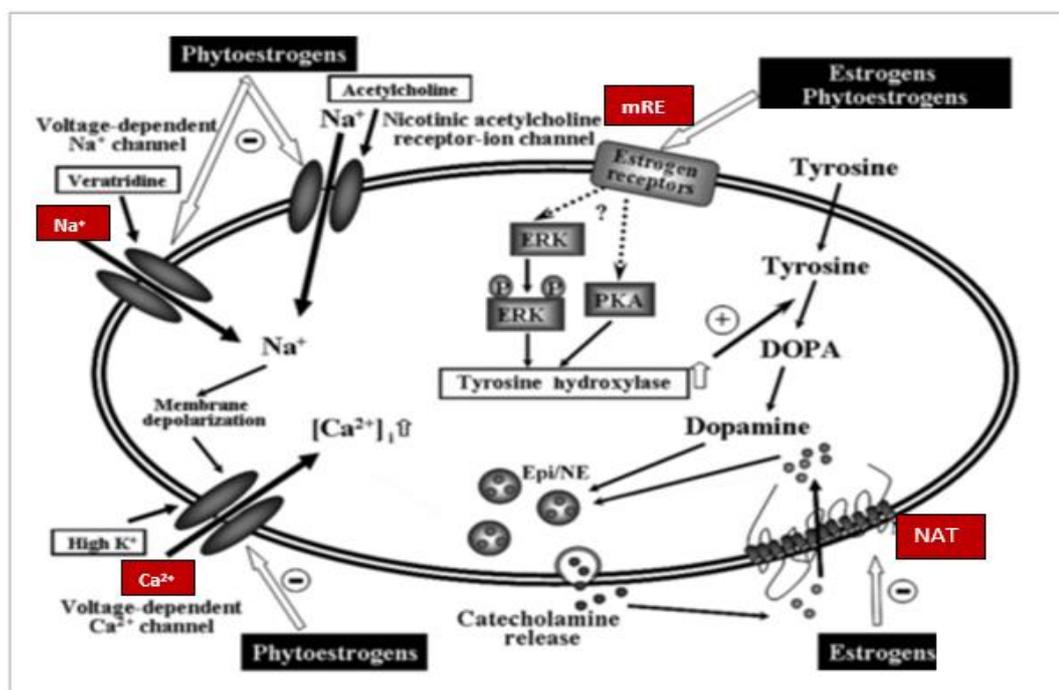


Figura 9: Influências do estrogênio e fitoestrogênicos na síntese, secreção e reabsorção de catecolaminas em células medulares adrenais. Canais de Sódio (Na^+) / Canais de Cálcio (Ca^{2+}) / Transportador de noradrenalina (NAT) / Receptor de membrana do estrogênio (mRE). *ERK1/2*: quinase 1 e 2 reguladas por receptor extracelular; *PKA*: proteína quinase A, *DOPA*: L-3,4-dihidrofenilalanina, *Epi/NE*: Epinefrina / norepinefrina. Fonte: Adaptado de Yanagihara et al. (2008).

Os resultados *in vitro* que mostram que a dadzeína em altas concentrações atenua a síntese e secreção de catecolaminas, assim como os de Toyohira et al.

(2010) em que a genisteína estimula a atividade de NAT e reduz a concentração de noradrenalina, podem explicar parcialmente alguns efeitos positivos das isoflavonas no organismo, como por exemplo cardioprotetor (WESTFALL e WESTFALL 2005; AJDZANOVIC et al., 2015).

2.4.2. Ação sobre o metabolismo energético

Devido ao fato de termos evidenciados alterações importantes no metabolismo lipídico anteriormente no modelo usado no presente trabalho (Vieira et al., 2018), um dos focos deste estudo foi avaliar índices aterogênicos, que utilizam a relação de lipídeos séricos e acúmulo de lipídeo hepático. Desta forma, cabe discriminar mais detalhadamente o efeito da soja e seus componentes sobre o metabolismo lipídico.

Em uma revisão realizada por Torres et al. (2006) as alterações no metabolismo lipídico pelo consumo de soja ou de seus componentes, principalmente a proteína, são relacionadas à diversos fatores como fonte proteica, perfil de aminoácidos e teor de isoflavonas. Os principais efeitos das isoflavonas da soja sobre o metabolismo lipídico parecem estar relacionados aos PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissoma), às C/EBP (proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT - citosina - citosine- adenosina -adenosine- timidina) e às SREBPs (proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol).

Os PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares que mudam a velocidade de transcrição de genes, e são expressos em diversos tecidos: tecido adiposo marrom, fígado, rins e músculos esqueléticos. Sua ativação está envolvida na síntese e armazenamento de lipídeos, na β -oxidação e dissipação de energia (NELSON e COX, 2011). As isoflavonas parecem ativar os PPARs resultando em uma regulação positiva da adipogênese, da absorção de ácidos graxos do plasma e aumentando as concentrações circulantes de adiponectina (TORRES et al., 2006). As C/EBP β e C/EBP δ atuam no estágio inicial da adipogênese para induzir a expressão de PPAR γ (WANG et al., 2017).

Os SREBPs são fundamentais para a homeostase lipídica. SREBP-1a e -1c regulam enzimas da biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos. SREBP-2 estão relacionadas à absorção e biossíntese de colesterol. São sintetizados no retículo endoplasmático e acompanhados pela proteína de ativação de clivagem (SCAP)

para o Golgi, para que se tornem transcricionalmente ativos. O SCAP é ativado quando a concentração intracelular de esteróis é baixa ou pela presença de insulina. (WANG et al., 2017; TORRES et al., 2006).

A insulina é capaz de modular enzimas envolvidas na síntese ou absorção de lipídeos por regulação das SREBPs. Linhas de evidência sugerem que a insulina estimula a síntese de ácidos graxos mediada por um aumento na expressão e excisão da forma ativa de SREBP-1c. Torres et al (2006) mostraram que quando há consumo de proteína de soja por ratos, ocorre uma redução na concentração de insulina, que por sua vez reduz os níveis de RNAm de SREBP-1 no fígado. Como consequência, há redução da expressão gênica de enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos. Além disso, a genisteína parece inibir a atividade de ERK1/2 em um estágio inicial da adipogênese, o que prejudica ação da insulina, suprimindo a adipogênese.

Além desses mecanismos, a genisteína parece ativar a adenosina 5' monofosfato proteína quinase (AMPK) no músculo de animais, através da via Janus quinase (JAK2), devido ao aumento de AMPc, gerando aumento na β -oxidação lipídica e conseqüentemente maior gasto calórico (PALACIOS-GONZÁLEZ et al., 2014).

Tanto pesquisas com humanos quanto com animais apresentam melhoras do metabolismo lipídico após o consumo de soja ou seus derivados, corroborando para prevenção de doenças cardíacas (SIMMEN et al., 2010; CHI et al., 2016; YAN et al., 2017). Cross et al (2017) observaram que o consumo de soja dietética, durante 28 semanas, por ratas ovariectomizadas (modelo utilizado para simular o aumento do tecido adiposo nas fêmeas na menopausa) melhorou a adiposidade, sensibilidade à insulina e reduziu a inflamação do tecido adiposo nestes animais.

Um estudo randomizado realizado em um centro de dislipidemia mostrou que o consumo de alimentos de soja (correspondentes a 30 g/dia de proteína de soja) por homens e mulheres entre 45 e 75 anos, durante 12 semanas, gerou melhora nos marcadores lipídicos aterogênicos, como LDL-c, TG, HDL-c e apoB, reduzindo o risco cardiovascular dos participantes (RUSCICA et al., 2016).

Em relação ao consumo de PIS, ratos obesos tratados com PIS apresentaram menor depósito de lipídeos no músculo esquelético em relação ao grupo controle. Provavelmente pela fosforilação da AMPK e da acetil-CoA carboxilase e/ou maior expressão de PPAR δ e proteína de desacoplamento mitocondrial (UCP3) que

estiveram aumentadas no grupo que consumiu PIS, o que indica maior oxidação de ácidos graxos, com aumento da termogênese. Além disso, os animais tratados com PIS apresentaram redução da SREBP-1 (PALACIOS-GONZÁLEZ et al., 2014).

Além do metabolismo de lipídeos, estudos mostram efeitos da soja e seus componentes no perfil glicídico. Ressalta-se que a maioria dos estudos mostram os efeitos da soja sobre a homeostase glicêmica em modelos animais de diabetes e obesidade, e utilizam a proteína isolada de soja (PIS) ou as isoflavonas suplementadas na dieta, e não a soja (grão) na dieta, como será realizada neste estudo.

Estudos prévios têm mostrado que o consumo de PIS na dieta promove níveis séricos mais baixos de glicose e insulina, bem como aumento da sensibilidade periférica à insulina (HURLEY et al., 1998; LAVIGNE et al., 2000; NORIEGA-LÓPEZ et al., 2007). De forma semelhante, em modelos de obesidade e diabetes tipo 2, o tratamento com isoflavona ou PIS diminui a glicemia ou a insulinemia (AOYAMA et al., 2000; ALI et al., 2005; AE PARK et al., 2006). Em humanos, embora os resultados sejam controversos, tem sido encontrada redução da glicemia e insulinemia de jejum em mulheres pós-menopausa tratadas com isoflavonas da soja (CHENG et al., 2004).

Os mecanismos pelos quais as isoflavonas exercem efeito positivo sobre o metabolismo glicídico ainda não estão bem elucidados, e não está claro se os efeitos da soja na insulinemia está associado a mudanças na secreção e/ou na sensibilidade periférica a insulina (NORIEGA-LÓPEZ et al., 2007).

2.4.3. Ação sobre resposta antioxidante

Estudos epidemiológicos sugerem que os hábitos alimentares presentes na Ásia estão relacionados com a menor incidência de doenças cardiovasculares (DCV) em comparação com populações ocidentais. A diferença considerável no alto consumo de soja da dieta tradicional asiática pode desempenhar esse papel devido à estimulação no sistema de defesa antioxidante e da saúde humana (ERBA, 2012). A proteína de soja e as isoflavonas genisteína e daidzeína, parecem conferir essa proteção antioxidante, contribuindo para a redução do estresse oxidativo e risco de DCV (VEGA-LOPEZ et al., 2005; HEMENAN et al., 2007; SANTANA et al., 2008).

A ação dos flavonóides como antioxidante ocorre pela doação de elétrons das hidroxilas livres presentes no núcleo de sua estrutura química e com ação quelante interagindo com metais e impedindo a reação de Fenton⁷, que é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (COOK e SAMMAN, 1996). A eficácia antioxidante dependerá de sua estrutura, tanto o número como a posição do grupo hidroxilo são relevantes, por exemplo, a genisteína e a daidzeína contêm três e duas substituições de OH, respectivamente, portanto a genisteína é o inibidor mais potente de H₂O₂ e O₂ do que a daidzeína (MALESEV e KUNTIC, 2007; XIAO et al., 2017).

Em relação a inibição da peroxidação lipídica, os flavonóides agem sequestrando os ânions superóxido e hidroxilas, no estado inicial da reação, e através da doação de átomos de hidrogênio para o radical peroxil, na fase terminal da reação (COOK e SAMMAN, 1996). As isoflavonas parecem agir na eliminação de radicais livres a partir da redução da peroxidação lipídica por sequestro de radicais livres ou por agirem como agentes quelantes de metais (BARBOSA, 2006; BLAY, 2010).

Erba et al (2012) realizaram um estudo para avaliar se o consumo de um suplemento de isoflavonas de soja (80mg/dia - coerente com a ingestão de isoflavonas em países asiáticos - durante 6 meses) fornecem proteção antioxidante em mulheres saudáveis, a partir da avaliação da resistência do DNA à danos oxidativos e da atividade de O-β-N-acetil-D-glucosaminidase (OGA), uma enzima que tem sido relacionada com doenças que envolvem estresse oxidativo forte. Elas apresentaram reduzido dano oxidativo ao DNA e menor atividade de OGA

A oxidação reduzida das partículas de LDL-c também tem sido atribuída às isoflavonas de soja, como mostra Schrader et al. (2012). Em seu trabalho com flavonoides eles apresentaram a genisteína como a principal responsável por induzir a Paraoxonase (PON1) - uma enzima que protege o LDL contra a oxidação - em uma cultura de hepatócitos. Entretanto, no mesmo estudo, ratos alimentados durante 22 dias com genisteína não apresentaram indução de PON1. Portanto, a ação protetora das isoflavonas da soja em relação redução da oxidação de LDL-c ainda precisa ser melhor estudada.

⁷ Reação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com ferro ou cobre.

Em relação ao consumo de PIS, Bazzoli et al (2002) avaliaram se seu consumo (40g/dia/4semanas) poderia produzir efeitos antioxidantes em um grupo de mulheres jovens praticantes de atividade física moderada. A porção diária de PIS continha 48 mg de genisteína e 110 mg de isoflavonas totais. Estas mulheres tiveram valores aumentados para um indicador de capacidade antioxidante, com base nos peróxidos lipídicos do plasma e leituras TAS (teste de estatuto antioxidante total) no plasma e obtiveram valores reduzidos para danos oxidativos. Entretanto, no plasma *in vitro* com isoflavonas não ocorreram efeitos nos valores de TAS.

Já Vega-López et al (2005) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos do consumo de PIS e isoflavonas de soja (50mg/1000kcal), sozinhos ou em combinação, sobre a capacidade antioxidante do plasma e em biomarcadores do estresse oxidativo em idosos com concentrações de LDL-c moderadamente elevadas. Observou-se que as concentrações de antioxidantes no plasma não eram significativamente diferentes e que as dietas relativamente altas em PIS ou em isoflavonas apresentaram pouco efeito sobre a capacidade antioxidante do plasma e biomarcadores de estresse oxidativo.

Santana et al., (2008) também avaliaram o consumo de soja em pacientes com hipercolesterolemia e viram, entretanto, que o consumo de soja, aumenta a capacidade antioxidante do plasma total. Os resultados opostos podem estar relacionados com a fonte de isoflavonas e com a quantidade consumida, pois são fatores que interferem na atividade antioxidante. (HEMENAN et al., 2007; MIRAGHAJANI et al., 2012).

Yoon e Parque (2014) avaliaram os efeitos da suplementação de isoflavonas e exercício físico sobre o estresse oxidativo em ratos idosos, avaliando TBARS e atividade de enzimas antioxidantes: SOD, GPx e CAT. As isoflavonas aumentaram as atividades de SOD e CAT e diminuíram TBARS, indicando uma diminuição no estresse oxidativo, o que sugere que a suplementação com isoflavonas de soja melhora a função antioxidante e previne a peroxidação lipídica.

Khan et al. (2012) também avaliaram a atividade das enzimas antioxidantes em animais. Para isso, induziram estresse oxidativo em ratos com TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato), um agente promotor de alterações moleculares e celulares que leva ao aumento do nível de MDA (malondialdeído), produto secundário da peroxidação lipídica, portanto, biomarcador de estresse oxidativo. Os animais que foram pré-tratados com isoflavonas (daidzeína e genisteína)

apresentaram eficaz melhoria do nível de MDA. Os mesmos animais apresentaram aumento significativo na atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Apoiando os achados anteriores, Qian et al. (2012) induziram um acidente vascular cerebral e realizaram um pré-tratamento intragastricamente com genisteína (1x/dia/14 dias) em ratos. Esse tratamento inibiu as espécies reativas de oxigênio induzida por isquemia, aumentaram as atividades das enzimas antioxidantes SOD e GPx, e diminuiu os níveis de MDA no acidente vascular cerebral dos animais.

Assim, pode-se observar que alguns estudos que avaliaram o consumo da soja ou suplementação de sua proteína isolada ou de sua isoflavona apresentaram resultados positivos em relação ao potencial antioxidante e redução do estresse oxidativo. Outros estudos mostraram que esse consumo ou suplementação tem nenhum ou pouco efeito sobre a capacidade antioxidante e estresse oxidativo no organismo. Estas contradições podem acontecer devido a diferenças no desenho do estudo, no modo de preparo da soja, na variação das populações em relação à capacidade de produzir equol - um metabolito com capacidades antioxidantes potentes -, à alterações na microflora intestinal, à origem étnica da população em estudo, ao metabolismo e biodisponibilidade das isoflavonas testadas, do tempo de trânsito intestinal dos indivíduos e animais utilizados, das taxas de digestão fecal, da presença de lactase - uma enzima fundamental para a conversão de isoflavonas na forma glicona para aglicona -, e outros fatores dietéticos, além das condições de armazenamento do alimento/suplemento (YUAN, 2007; HEMENAN, 2007; NIELSEN e WILLIAMSON 2007; SANTANA et al., 2008; MIRAGHAJANI, 2012).

Ainda há controvérsias em relação a eficácia no consumo de isoflavonas na ação antioxidante no organismo humano. E não são conhecidos os efeitos do consumo materno de soja ou PIS somente no período da lactação sobre sua atividade antioxidante e alterações no estresse oxidativo na progênie a curto e longo prazos.

2.5. SOJA E PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

Já foi descrito que as isoflavonas podem ser transferidas da mãe para a prole durante a gravidez através da placenta e durante a lactação pelo leite, estando a prole exposta a este componente da soja, que como já abordado, apresenta ação estrogênica (FRANKE et al., 1998; DOERGE et al., 2001; FOSTER et al., 2002;

JEFFERSON 2012; JARRELL et al., 2012). Conhecer os potenciais benefícios ou efeitos adversos da exposição à fitoestrogênios nas fases críticas do desenvolvimento é importante para otimizar o estado nutricional, promover a saúde e prevenir doenças futuras na vida adulta (ANDRES et al., 2015).

Alguns estudos expõem efeitos positivos com a oferta precoce de componentes da soja na dieta. Bernardo et al. (2015) observaram que a ingestão materna de genisteína durante a gestação, em concentração fisiológica, atenuou os efeitos deletérios da exposição ao xenoestrogênio bisfenol-A (BPA) em relação a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões na próstata dos filhotes na idade adulta. Apoiando os efeitos da genisteína sobre o BPA, estudos mostraram que o consumo de genisteína durante a lactação protegeu a glândula mamária da prole contra a ação do BPA sugerindo quimioprevenção mamária (WANG et al., 2014; BETANCOURT et al., 2014)

A fim de avaliar os efeitos na prole de ratas que receberam BPA e/ou soja (S) e/ou da genisteína (GEN) isolada durante a gestação e lactação, Cao et al. (2015) observaram as mães alimentadas com S apresentaram menor massa corporal (MC) durante a gravidez, e tiveram maior ingestão alimentar (IA) durante a lactação, sem alterar a MC. Os seus descendentes (ambos os sexos), no entanto, se tornaram mais pesados (mais pronunciados nos machos) no pré-desmame. A S também aumentou a IA e acelerou o início da puberdade na prole feminina. Os machos expostos à dieta de soja+BPA apresentaram testículos mais leves. O BPA não teve efeitos independentes.

Won et al. (2017) avaliaram os efeitos do consumo de isoflavonas durante a gestação e lactação sobre a expressão gênica hepática, o que seria útil para monitorar o desenvolvimento do fígado dos descendentes. Evidenciaram que o consumo materno de proteína de soja com baixo teor de isoflavona alterou significativamente o perfil de expressão gênica no fígado da prole, o que não ocorreu com a prole cuja mãe recebeu dieta com caseína suplementada com genisteína, sugerindo que a expressão de genes hepáticos pode ser alterada pela composição de aminoácidos ou baixas concentrações de isoflavonas da PIS em vez da isoflavona de soja isolada em altas concentrações.

Han et al (2017) investigaram os efeitos do consumo materno de PIS e genisteína sobre a prole de ratas aos 21 dias de idade. As mães receberam o tratamento duas semanas antes do acasalamento, durante a gestação e a

lactação. A prole PIS apresentou redução da MC do dia 12 até o final do experimento, menores níveis séricos de TG, ácidos graxos livres e HDL-c. As proles PIS e GEN apresentaram redução dos níveis séricos de CT. A proporção de colesterol HDL-c para CT foi aumentada na prole GEN. Não houve diferenças significativas nos níveis séricos de glicose, de insulina e HOMA-IR, nem nas concentrações hepáticas de TG ou colesterol, o que sugere que as diminuições nos níveis séricos de triglicerídeos no grupo PIS não foram decorrentes de acumulação hepática de TG.

Yoon et al (2017) compararam os efeitos sobre o estresse oxidativo e metabolismo lipídico na prole de ratas que receberam uma dieta normoproteica (20% PIS) e com baixo teor proteico (10% PIS), composta por PIS como única fonte de proteína, durante a gestação e lactação. Ao desmame, a prole PIS 10% apresentou menores níveis de TG e HDL-c séricos, menor TG hepático e maior colesterol hepático comparado com a prole 20% PIS. Os indicadores do estresse oxidativo, incluindo níveis globais de glutathiona e TBARS, não sofreram alterações, entretanto as atividades de catalase e GPx foram significativamente maiores no grupo 10% PIS do que as do grupo 20% PIS.

Em um estudo com suínos, Hu et al (2015) observou que o tratamento materno com glicitina (uma isoflavona da soja) durante a gestação e a lactação gerou maior MC nas proles ao desmame e, durante a lactação, houve aumento da atividade de SOD, T-AOC (capacidade antioxidante total), CAT e GPx e diminuição do MDA plasmático e do leite, indicando redução da peroxidação lipídica.

Cederroth e Nef (2009) evidenciaram que a exposição materna na lactação a dieta rica em fitoestrógenos (~25% de proteína de soja) diminuiu o peso e a adiposidade corporal, sem influenciar na resposta à tolerância a glicose nos filhotes machos na idade adulta. Já a exposição na gestação não alterou o peso e a adiposidade corporal, mas melhorou a resposta à tolerância à glicose na prole adulta. Assim, é possível que os efeitos metabólicos da soja sejam dependentes do período da vida em que a exposição ocorre.

Kaludjerovic e Ward (2015) forneceram uma dieta com isoflavonas para ratas uma semana antes do acasalamento e mantiveram a dieta na gestação e lactação. Sua prole apresentou melhorias na densidade mineral óssea, com maior resistência à fratura no fêmur e coluna lombar quando comparadas ao grupo que não consumiu isoflavonas.

Entretanto, nem todos os estudos relacionam o consumo de componentes da soja durante fases críticas do desenvolvimento de forma positiva. Jahan-mihan et al. (2011) demonstraram que o tratamento materno com PIS durante a gestação e lactação gerou aumento da glicemia em jejum, insulinemia e índice HOMA-IR na sua prole macho. Sugerem que a PIS quando comparada com caseína durante a gestação e lactação aumenta o risco de desenvolver características da síndrome metabólica nos filhotes.

Pfaehler et al. (2012) mostraram que os filhotes de ratas que receberam concentrações diferentes de isoflavonas durante a gestação e lactação (0 ppm, 5 ppm, 50 ppm, ou 1000 ppm) não apresentaram diferença no peso corporal ao desmame e na idade adulta. Entretanto, os filhotes cujas mães receberam 50 ppm de isoflavonas tiveram aumento da concentração sérica de leptina e adiponectina, afetando a produção hormonal desses animais, sugerindo que a dose de isoflavonas seja um fator importante a se considerar.

Outros estudos apontam efeitos tóxicos dos fitoestrógenos sobre o sistema reprodutor. Essas alterações podem causar anormalidades no ciclo estral e alterações na função do ovário e dos testículos, levando ao desenvolvimento de puberdade precoce na prole fêmea e diminuição da produção de testosterona na prole macho (JEFFERSON et al, 2006; LEHRAIKI et al., 2011; CEDERROTH et al., 2010; CAO et al., 2015).

Por outro lado, Ruhlen et al. (2008) mostraram que filhotes de camundongos cujas mães consumiam baixa concentração de fitoestrógenos da soja durante a gestação e lactação apresentaram aumento de estradiol endógeno. Este aumento foi associado com efeitos adversos sobre o sistema reprodutor e sobre o estado nutricional dos filhotes machos na idade adulta, que se tornaram obesos, hiperleptinêmicos e resistentes à insulina. Os animais expostos à dieta rica em fitoestrogênios da soja não desenvolveram estas alterações.

Comparando os efeitos do consumo de soja (grão) com sua proteína isolada durante a lactação, estudo recente do nosso grupo (Vieira et al., 2018; Vieira, 2016) observou que o consumo materno do alimento soja gerou alterações benéficas em relação a composição corporal e perfil lipídico na progênie, já o consumo da PIS levou ao aumento do colesterol total, dos TG e da insulinemia. Desta forma, o alimento programou a prole de maneira diferente de seu composto isolado.

Diante das divergências expostas, ainda há necessidades de mais pesquisas para esclarecer os efeitos do consumo materno de soja e seus componentes em fases críticas do desenvolvimento, já que o recém-nascido é extremamente sensível às exposições que sofrem devido à organogênese, ao crescimento rápido e à diferenciação extensa dos tecidos durante estes períodos de desenvolvimento, portanto, pequenas perturbações podem desencadear consequências importantes (JEFFERSON, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do consumo de dieta a base de soja e de uma dieta a base de proteína isolada de soja sobre a função da medula adrenal, resposta antioxidante e índices de aterogenicidade em ratas lactantes e suas proles ao desmame e na idade adulta.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nas ratas lactantes que receberam dieta a base de soja ou proteína isolada de soja, ao final da lactação:

- o estado nutricional (ingestão alimentar e massa corporal) ;
- a concentração sérica do 17- β estradiol;
- os índices de aterogenicidade;
- os biomarcadores do estresse oxidativo (TBARS e GSH/GSSG) e atividade de enzimas antioxidantes no tecido hepático (SOD, CAT, GPx, GR);
- o conteúdo total de catecolaminas na medula adrenal.

Avaliar nos filhotes machos ao desmame (21 dias) e na idade adulta (150 dias), cujas mães receberam ração a base de soja ou proteína isolada de soja na lactação:

- o estado nutricional (ingestão alimentar e massa corporal);
- a reserva de colesterol e triglicérideo hepáticos;
- os índices de aterogenicidade;
- os biomarcadores do estresse oxidativo (TBARS e GSH/GSSG) e atividade de enzimas antioxidantes no tecido hepático (SOD, CAT, GPx, GR);
- o conteúdo total de catecolaminas na medula adrenal;
- a expressão proteica da enzima TH na medula adrenal (150 dias);
- a secreção basal e estimulada de catecolaminas pela medula adrenal (150 dias).

4 . METODOLOGIA

4.1. CUIDADOS ÉTICOS

O modelo experimental usado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (Parecer nº 018/2014). O estudo foi conduzido de acordo com os regulamentos locais (Conselho Nacional de Pesquisa em Animais de Estimação, CONCEA, Brasil).

4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Ratas *Wistar* lactantes (3 meses-250g de massa corporal) com a ninhada foram obtidas do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF no primeiro dia após o nascimento, e foram mantidas no biotério de experimentação do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNE), do Departamento de Nutrição da UFJF, com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00h-19:00h) controlados. Água e ração foram ofertadas *ad libitum* aos animais durante todo o período experimental.

Para cada grupo foram estudadas 8 ratas lactantes (8 ninhadas), com 6 filhotes machos em cada ninhada, número de animais que confere maior potencial lactotrófico (FISHBECK e RASMUSSEN, 1987), perfazendo um total de 48 filhotes por grupo, divididos nos seguintes grupos experimentais:

-Grupo Controle Caseína (C): recebeu dieta à base de caseína (16,3% de proteína, 56% de carboidrato, 7% de lipídeo);

-Grupo Proteína Isolada de Soja (PIS): livre acesso a dieta à base de proteína isolada de soja (18,3% de proteína, 56% de carboidrato e 7% de lipídeos).

-Grupo Soja (S): recebeu dieta à base de farinha de soja orgânica como fonte proteica (20,1% de proteína, 47,8% de carboidrato, 16,8% de lipídeo).

O tratamento das ratas (Figura 10) iniciou no primeiro dia após o nascimento dos filhotes e terminou ao final da lactação (21 dias). Os filhotes foram desmamados aos 21 dias e 3 filhotes de cada ninhada foram randomicamente colocados em gaiolas individuais com livre acesso a água e a ração comercial (Nuvilab®, Paraná,

Brazil; composição: 22% proteína, 66% carboidrato e 11% lipídeos) até os 150 dias de idade (n=24). O restante das proles (n=24), juntamente com suas mães, após jejum de 8 horas, foram anestesiados com Ketamina (90 mg/kg de peso corporal, i.p.) e Xilazina (10 mg/Kg peso corporal, i.p.), o sangue coletado por punção cardíaca e a eutanásia completada com o rompimento do diafragma. As proles mantidas até os 150 dias de idade foram eutanasiadas pelo mesmo procedimento.

O sangue coletado foi centrifugado (3500 rpm por 15 minutos) para obtenção do soro, que foi armazenado em freezer a -80°C até a realização das análises. Foram coletados os seguintes tecidos: fígado para avaliação do triglicerídeo e colesterol hepáticos e para ponderação das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica; adrenal direita para análise da expressão de TH e; adrenal esquerda para dosagem de conteúdo total de catecolaminas (mantidas em ácido acético) e para realização do ensaio de secreção *in vitro* logo após a adrenalectomia e dissecação da medula. Todos os tecidos foram armazenados em freezer -80°C, presente no laboratório de Análise Instrumental de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFJF, até a realização das análises.

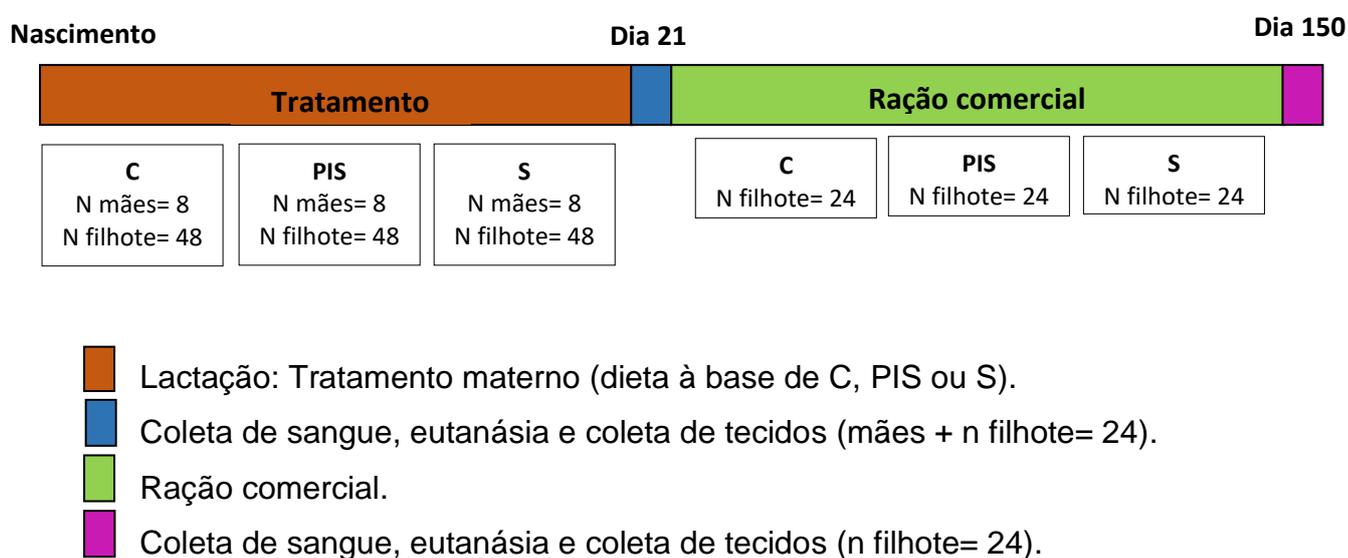


Figura 10: Representação esquemática do procedimento experimental.

4.3. RAÇÕES EXPERIMENTAIS

As rações foram preparadas no laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFJF. Para confecção da ração a base de soja

utilizou-se soja orgânica comprada no comércio local. Inicialmente realizou-se o preparo da farinha de soja. A fim de inibir fatores anti-nutricionais, os grãos de soja foram selecionados manualmente, pesados e colocados em estufa ventilada a 60°C por 30 minutos. Para extração da casca, a soja foi colocada em água fervente durante 3 minutos e deixada de molho em água limpa por 4 horas. A água foi desprezada e os grãos colocados para cocção em panela de pressão durante 30 minutos. Após o cozimento, os grãos foram colocados em estufa ventilada a 60°C até a secagem e, na sequência, moídos (SOARES et al., 2005). Posteriormente, avaliou-se a composição centesimal da farinha de soja obtida por métodos já padronizados (AOAC, 1984). Os dados obtidos foram utilizados para calcular a dieta a base de soja, sendo que os conteúdos de proteína, lipídios e fibras foram corrigidos para os teores presentes na farinha de soja.

Para a confecção da dieta a base de PIS, utilizou-se produto obtido no comércio local; e para a dieta a base de caseína, foi utilizada a caseína (teor proteico: 80%, RHOSTER, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). Às dietas foram adicionadas as misturas de minerais e vitaminas, formuladas conforme a recomendação do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93G) para roedores. Os ingredientes das rações (Tabela 1) foram pesados e homogeneizados em batedeira, com água fervente. A massa obtida, transformada em pellets e seca em estufa ventilada a 50°C por 24 h, e após a identificação, congelada e armazenada em freezer a -4°C. A composição centesimal das dietas depois de prontas foi feita pelos mesmos métodos utilizados na análise da soja (AOAC, 1984). (Tabela 1).

No estudo não foi possível analisar a quantidade de isoflavonas presente na dieta, porém foi feita a estimativa de acordo com o conteúdo de isoflavonas na farinha de soja e PIS descrita na literatura. De acordo com Barbosa et al (2006), 100 gramas de farinha de soja integral contêm 200 mg de isoflavonas, enquanto que 100 gramas de proteína isolada de soja tem 124 mg de isoflavonas. A partir da quantidade de farinha de soja e proteína isolada de soja adicionada na ração, foi estimada 108 mg de isoflavonas na dieta do grupo S e 24,8 mg no grupo PIS por 100 g de dieta. Baseado nessa informação foi determinada a ingestão materna de isoflavonas, considerando a quantidade média de ingestão de ração durante a lactação pelas ratas do grupo S e PIS.

Tabela 1: Composição das dietas dos grupos experimentais.

Ingredientes (g/100g)	Controle Caseína	Proteína Isolada de Soja	Soja
Caseína ¹	20	-	-
Farinha de Soja ²	-	-	54
Proteína Isolada de Soja ³	-	20	
Amido de Milho	39,7	39,7	12,0
Amido ⁴ dextrinizado ¹	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10	10	10
Celulose ¹	5	5	3,5
Óleo de Soja ⁵	7	7	2,3
Mix Mineral ¹	3,5	3,5	3,5
Mix Vitamina ¹	1,0	1,0	1,0
L-cisteína ¹	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina ¹	0,25	0,25	0,25
BHT ¹	0,0014	0,0014	0,0014
Macronutrientes (g/100g)			
Proteína	16,3	18,3	20,1
Carboidrato	56,0	56,0	47,8
Lipídeos	7,0	7,0	16,8
Fibra total	5,0	5,0	5,0
Total de energia (kcal/100g)	352,4	360,2	422,8

¹Ingredientes adquiridos da RHOSTER (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil); ²Marca Jasmine (Curitiba, PR, Brasil); ³Marca Nutrisoy Alimentos (Colombo, PR, Brasil); ⁴Marca Milhena; ⁵Marca Leve (orgânico)

4.4. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

O consumo de ração e a massa corporal foram monitorados diariamente por toda a lactação (21 dias) e após o desmame foram verificados a cada 4 dias até à eutanásia (150 dias).

A quantidade de ração diária ingerida pelos animais foi determinada pela diferença entre o peso da ração que restou na gaiola (Rf) e a quantidade total oferecida quatro dias antes da pesagem (Ri):

$$\text{Ingestão de ração (g)} = (R_i - R_f)n/4$$

Onde “n” corresponde ao número de animais na gaiola e 4 ao número de dias.

4.5. AVALIAÇÃO HORMONAL

O 17 β -estradiol sérico das mães foi avaliado por radioimunoensaio (RIA) utilizando kit comercial específico (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostics Division, Costa Mesa, CA), com coeficiente de variação intra-ensaio de 5,5% com sensibilidade de 10 pg/mL. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.6. ÍNDICES DE ATEROGENICIDADE

Estimamos os índices de aterogenicidade pela razão entre os seguintes lipídeos sanguíneos: colesterol total (CT)/HDL-c, LDL-c/HDL-c e pela fórmula [(CT-HDL-c)/HDL-c] (CHOI et al., 1991; FRANKENFELD, 2009). Cabe mencionar que para a construção desses índices foram utilizados os dados do perfil lipídico avaliado anteriormente neste mesmo modelo experimental (VIEIRA, 2016).

4.7. AVALIAÇÃO DO TRIGLICERÍDEO E COLESTEROL HEPÁTICOS

As amostras de fígado (0,5 g) foram homogeneizadas em álcool isopropílico (1 mL) com auxílio do sonicador programando com: 10"pulso ON/15" pulso OFF/ amplitude de 40%/ time 3'20". E foram centrifugadas a 5900rpm por 10 minutos a 4°C e deixado em repouso *overnight* na geladeira.

As concentrações de triglicerídeo (TG) e colesterol hepáticos foram determinadas utilizando espectrofotômetro, seguindo recomendações das bulas dos kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). As concentrações foram expressas em (mg/dL)/mg de tecido.

4.8. BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO

As análises dos biomarcadores de estresse oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Metabólica da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.8.1 Peroxidação lipídica por TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas que, geralmente, são mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre os quais o malondealdeído (MDA) é o principal. Portanto, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são amplamente utilizados como indicadores da peroxidação de lipídios.

A mensuração dos metabólitos reativos ao TBARS foi realizada em placa de 96 poços pelo método descrito por Buege e Aust (1979).

100mg de fígado foi homogeneizado em 1 mL de tampão Tris-HCl (20mM) e o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante foram misturados com 0,25mL de ácido tricloroacético (TCA) (28% p/vol diluído em HCl 0,25 N), 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% diluído em ácido acético 0,25 N) e 12,5 mL de butilhidroxitolueno (BHT) (125 mM diluído em etanol), aquecido por 15 minutos a 95°C e colocado em banho de gelo. Foram transferidos 0,6mL da mistura para um tubo de polipropileno e adicionados 0,6mL de butanol. Os tubos foram agitados e, após uma centrifugação de 10.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante retirado. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 535nm e a água destilada foi utilizada como branco. Uma curva padrão com o MDA foi construída. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.8.2. Glutathiona total, oxidada (GSSG) e reduzida (GSH)

A Glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existe no organismo em duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Ela é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante. A relação redox GSH/GSSG está diretamente relacionada com o estresse oxidativo no organismo: quanto maior o valor, menor o estresse oxidativo.

O conteúdo de glutathiona total e oxidada (GSSG) foi dosado pelo método proposto por Griffith (1980). Amostras de fígado (100 mg) foram homogeneizadas com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5%, e em seguida centrifugadas por 10 minutos à 4°C. Para a determinação de glutathiona total foram adicionados 10 μ L do sobrenadante da amostra em uma placa de 96 poços, em seguida 150 μ L da mistura

de trabalho (95 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48 μ M de NADPH, 0.031 mg/ml de DTNB, 0.115 unidades/ml de glutathiona redutase, e 0.24% de ácido de sulfosalicílico). As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μ L de NADPH 0,16mg/mL foram adicionados. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA à 412 nm.

Para determinação da concentração de GSSG o sobrenadante do homogenato hepático (100 μ L) foi adicionado de 2 μ L de 2-vinilpiridina (PM= 105,14 g/mol). O pH da solução foi ajustado para valores entre 4 e 6 utilizando trietanolamina (TEA: PM=149,188 g/mol). Após incubação por 60 minutos as amostras foram utilizadas no ensaio de acordo com o mesmo procedimento da glutathiona total.

Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar as concentrações. Para determinação da glutathiona reduzida (GSH) foi subtraída a oxidada da total. Os resultados foram expressos em nmoles por mL de amostra.

4.8.3. Atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método proposto por Paglia e Valentine (1967) adaptado.

Amostra de tecido hepático (50 mg) foi homogeneizada em 0,5 mL tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 1 mM EDTA, pH=7,0. Após centrifugação a 10.000g por 10 minutos a 4° C o sobrenadante foi retirado. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L de tampão de ensaio, 10 μ L de amostra e 80 μ L do mix (0,25mM NADPH, 2,1 mM de GSH, 0,5 U/mL de glutathiona redutase e 250 μ L de azida sódica 40mM). Após 3 minutos, foi adicionado 10 μ L de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,2 mM, utilizado como substrato da reação. A decomposição do NADPH foi monitorada em um leitor de placas a 340 nm. Foram realizadas 5 leituras, com intervalo de 20 segundos entre elas. A atividade da GPx foi calculada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade da GPx} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{3,73\mu\text{mol}/\text{min}} \times \frac{VR}{VA}$$

Onde: Δ_{A340} é o delta da absorbância por minuto; 3,73 é o coeficiente de extinção molar do NADPH; VR é o volume de reação em mL; e VA é o volume de amostra em mL.

A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína (U/mg de proteína).

4.8.4. Atividade da enzima Glutaciona Redutase (GR)

A atividade enzimática da GR foi determinada de acordo com o método proposto por Carlberg e Mannervik (1985).

Amostra de tecido hepático (50 mg) foi homogeneizada em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 1 mM EDTA, pH=7,5. Após centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4° C, 10µL de sobrenadante foi adicionado em uma placa de 96 poços juntamente com 100µL de GSSG 2mM, 40 µL de tampão de ensaio e 50 µL NADPH 0,4 mM. A atividade da glutaciona redutase foi mensurada espectrofotometricamente através da redução da absorbância causada pela oxidação do NADPH a 340 nm. Foram realizadas 10 leituras, com intervalo de 10 segundos entre elas e a atividade da GR foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Atividade da GR} = \frac{\Delta_{A340}/\text{min}}{3,73\mu\text{mol/min}} \times \frac{\text{VR}}{\text{VA}}$$

Onde: Δ_{A340} é o delta da absorbância por minuto; 3,73 é o coeficiente de extinção molar do NADPH; VR é o volume de reação em mL; e VA é o volume de amostra em mL.

A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína (U/mg de proteína).

4.8.5. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Atividade da SOD foi determinada no fígado de acordo com o método de Marklund e Marklund (1974).

Amostras de fígado (100mg) foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (50mM, pH 7,0), centrifugado a 10.000g a 4°C por 10 minutos e retirado o

sobrenadante para análise da amostra. As dosagens foram feitas usando placa de Elisa. Foi pipetado 30 μ L de sobrenadante, 99 μ L de tampão fosfato, 6 μ L de MTT (1,25mM) (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e 15 μ L de pirogalol (100 μ M). Para o branco foi pipetado 144 μ L de tampão fosfato e 6 μ L de MTT e para o padrão 129 μ L de tampão, 6 μ L de MTT e 15 μ L de pirogalol. Em seguida a placa foi incubada por 5 minutos em estufa a 37°C. Logo após, foram adicionados 150 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) (PM= 78,13 g/mol) para parar a reação. As absorbâncias foram lidas no leitor de Elisa em um comprimento de onda de 570nm. Os dados foram expressos em U/mg de proteína.

4.8.6. Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada de acordo com Aebi (1984). Amostras de fígado (100mg) foram homogeneizadas em 1mL de tampão fosfato 100mM (pH 7,2) e o homogenato foi centrifugado a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. Em um tubo de polipropileno foi colocado 50 μ L de tampão fosfato 100mM (pH 7,2), 40 μ L de água destilada e 10 μ L do sobrenadante do homogenato. A reação foi iniciada pela adição de 0,9mL de H₂O₂ (10mM). As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240nm. Água destilada foi utilizada como branco. A atividade da catalase foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (39,4 M⁻¹cm⁻¹), segundo a lei de Lambert Beer. Os dados foram expressos em μ mol/mg de proteína.

4.9. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA MEDULA ADRENAL

As adrenais foram cuidadosamente dissecadas e limpas para retirada de tecido adiposo, pesadas em balança de precisão e receberam tratamentos diferenciados, de acordo com o protocolo ao qual eram destinadas: a esquerda que teve parte armazenada em ácido acético para dosagem de conteúdo total de catecolaminas, e parte onde a medula foi dissecada para realização do ensaio de secreção *in vitro* e foram, posteriormente, congeladas a -80°C ; já a direita foi congelada em -80°C para análise da expressão da TH.

4.9.1. Análise *in vitro* da secreção de catecolaminas

Foram utilizados três agentes estimulantes que agem por mecanismos diferentes:

- Potássio: gera a estimulação via a indução da despolarização da membrana plasmática;
- Carbamilcolina (análogo sintético da acetilcolina): gera a estimulação via receptores colinérgicos.
- Cafeína: gera a estimulação via a mobilização de Ca^{2+} de *pools* intracelulares.

As medulas adrenais foram dissecadas, com auxílio de pinças, tesouras oftalmológicas e microscópio estereoscópio no momento da eutanásia. Posteriormente, foram mantidas em solução salina Krebs-Hepes com 0,5% de albumina, composta por (em mM): Cl^- 154,26; Na^+ 143,4; Ca^{2+} 2,5; Mg^{2+} 1,18; SO_4^{2-} 1,2; K^+ 2,9 e Hepes 25. Foi adicionada glicose nesta solução, em concentração semelhante às médias glicêmicas dos grupos experimentais de onde as medulas foram extraídas, com o objetivo de manter a mesma concentração de glicose observada no animal vivo. O pH da solução salina foi 7,2.

A secreção basal de catecolaminas foi avaliada a partir das medulas incubadas em solução salina sem estimulador. A secreção foi estimulada pela incubação das medulas em solução salina Krebs-Hepes com 30 mM de potássio ou 50 μM de carbamilcolina ou 25 mM de cafeína. Nos experimentos de estimulação com altas concentrações de potássio e cafeína foi retirada quantidade equivalente de Na^+ para manter a osmolaridade da solução.

As estimulações foram feitas em placas de cultivo de células do tipo Costar com 96 poços à temperatura ambiente. Para a medula de cada animal utilizamos 12 poços consecutivos da placa. A sequência de estimulação da medula de cada grupo foi: basal, lavagem, basal, lavagem, basal, lavagem, estímulo, lavagem, basal, lavagem, basal, lavagem. A medula foi deixada por cinco minutos em cada poço de solução basal e de estímulo (Figura 11). Ao fim da estimulação, as soluções de incubação foram acrescidas de ácido acético concentrado (20 μL) para conservação das catecolaminas e foram armazenadas a -80°C até a dosagem pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol (KELNER et al., 1985). Todo procedimento de dissecação e estimulação *in vitro* da medula adrenal foi realizada no laboratório de Composição de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFJF.

Os resultados das análises da secreção de catecolaminas foram expressos em ng/mg da adrenal.

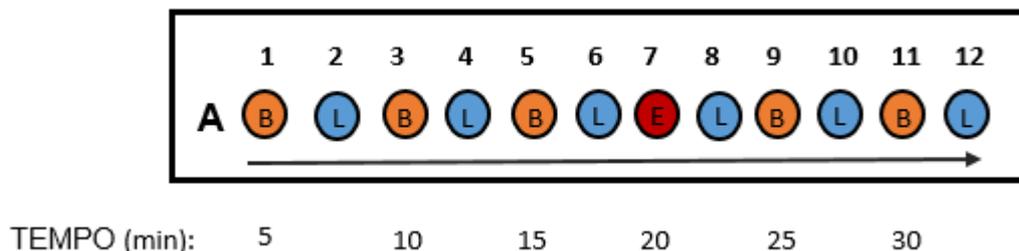


Figura 11: Esquemática do sistema utilizado para avaliação da secreção estimulada de catecolaminas em medulas adrenais isoladas de ratos. B=solução basal / L=solução de lavagem / E=solução de estímulo.

4.9.2. Dosagem de catecolaminas totais

As catecolaminas foram dosadas no laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia da UFJF pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol (KELNER et al, 1985). Para avaliar o processo de secreção, foram medidas as catecolaminas secretadas e as remanescentes nas células da medula. As glândulas foram congeladas/descongeladas por três vezes, para posteriormente serem maceradas e o material centrifugado a 14.000 rpm por cinco minutos, para a utilização do sobrenadante.

As medulas receberam o mesmo tratamento citado acima para as glândulas. Foram utilizados 50 µl de cada amostra, tanto das glândulas como das catecolaminas secretadas e remanescentes das medulas. A este volume foi adicionado 250 µL de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0 e, a seguir, 25 µL de ferricianeto de potássio 0,5%. A solução foi misturada e incubada por 20 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 500 µl de ácido ascórbico(6%)/NaOH 10 N, na proporção 1:19. Após este passo foi adicionado 2,0 mL de água destilada e a solução homogeneizada novamente para ser submetida à leitura da fluorescência em fluorímetro. Os comprimentos de onda usados para a leitura foram 420 nm de excitação e 510 nm de emissão. Paralelamente à dosagem de catecolaminas foi feita curva padrão de adrenalina. Todas as dosagens foram feitas em duplicatas e com os tubos em banho de gelo durante todo o procedimento. A concentração de

catecolaminas absolutas foi expressa em μM e da concentração relativa de catecolaminas pelo peso da adrenal foi expressa em ng/mg de adrenal.

4.9.3. Avaliação da expressão da Tirosina Hidroxilase (TH) na adrenal

Esta análise foi realizada no laboratório de Fisiologia Endócrina da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) pelo método de Western Blotting. As glândulas adrenais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato (pH7,4), contendo 1 μL de coquetel de inibidores de proteases (1 mg/ml de aprotinina, leupeptina e inibidor de tripsina) e centrifugadas a 4°C, 500 rpm por 15 minutos. A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976).

A quantidade específica de proteína total (10 μg) foi aplicada em gel de acrilamida a 10% (SDS-PAGE) e foram separadas segundo o peso molecular. Ocorreu então, a transferência para uma membrana de nitrocelulose (Hybond P ECL membrana, Amersham Biosciences, UK). A membrana foi bloqueada com leite desnatado (5%) em tampão TBS por 90 minutos. Em seguida a membrana foi lavada e incubada a 4°C (*overnight*) com anticorpo primário específico (Anti-TH – mouse monoclonal IgG, Sigma-Aldrich, USA; 1:2000). Após lavagem, a membrana foi lavada e incubada com o anticorpo secundário conjugado com a HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:1500) por 1 hora em temperatura ambiente.

As bandas foram reveladas por quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences) acompanhada por exposição a filme de autoradiografia. As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando o software Scion Image. A tubulina foi utilizada como padrão.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 5 e expressos como média \pm erro padrão da média. Utilizou-se a análise de variância ANOVA *one-way* com pós- teste de *Newman-Keuls* para avaliar as diferenças entre grupos C, PIS e S. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p valor <0,05.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITOS DO CONSUMO DE SOJA OU PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA DURANTE A LACTAÇÃO NAS RATAS LACTANTES (MÃES)

5.1.1. Estado nutricional e consumo de isoflavonas

As ratas lactantes não apresentaram alteração na ingestão alimentar (Figura 12A) durante da lactação, sendo observado apenas um aumento pontual de consumo das mães PIS e S no dia 18 em relação ao grupo C ($p=0,0235$), o que não interferiu na massa corporal (Figura 12B) durante a lactação.

A estimativa da quantidade de isoflavona consumida diariamente pelas ratas S foi $41,3 \pm 1,785$ mg e pelas ratas PIS foi $9,87 \pm 2,039$.

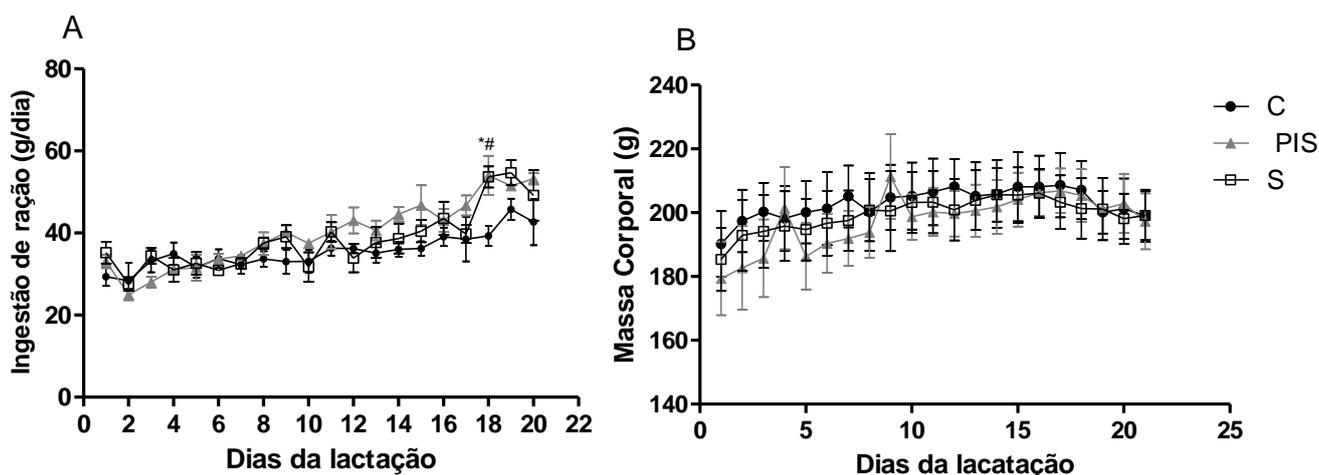


Figura 12: Consumo diário de ração (A) e massa corporal (B) das mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 8 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs PIS.

5.1.2. Concentrações séricas de 17 β -estradiol e Índices de Aterogenicidade materno

Foi evidenciado diminuição do 17 β -estradiol nas ratas que consumiram soja durante a lactação comparado às ratas que do grupo C que consumiram caseína (-

41,6%, $p=0,0186$) (Tabela 2). Este parâmetro não foi alterado nas ratas que consumiram PIS. Os índices de aterogenicidade 1 (CT/HDL-c), 2 (LDL-c/HDL-c) e 3 [(CT- HDL-c)/HDL-c] não foram alterados em ambos os grupos PIS e S (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações séricas de 17 β -estradiol e índices de aterogenicidade das ratas lactantes C, PIS e S ao final da lactação.

Variáveis avaliadas	C	PIS	S
17 β estradiol (pg/mL)	78,88 \pm 8,26	62,84 \pm 7,57	46,02 \pm 4,21*
Índice 1	2,15 \pm 0,17	2,19 \pm 0,17	2,69 \pm 0,21
Índice 2	1,05 \pm 0,15	1,03 \pm 0,11	1,47 \pm 0,20
Índice 3	1,15 \pm 0,17	1,19 \pm 0,17	1,69 \pm 0,21

Índice 1= CT/HDL-c; Índice 2= LDL-c/HDL-c; Índice 3= [(CT - HDL-c)/HDL-c]. C: controle caseína; PIS: proteína isolada de soja; S: soja. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais por grupo. Dados expressos como média \pm epm * vs C; # vs PIS ($p<0,05$).

5.1.3 Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes no fígado

Como observado na figura 13, somente às ratas que consumiram PIS durante a lactação apresentaram redução de TBARS (-38,24%; $p=0,0462$) quando comparado ao grupo C.

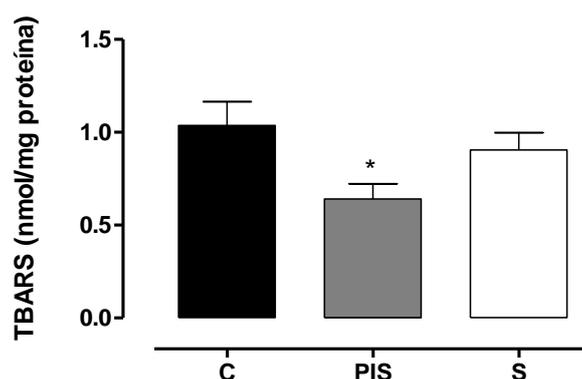


Figura 13: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenato hepático das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p<0,05$ vs C.

A atividade das enzimas Glutationa total (A), Glutationa oxidada (GSSG) (B), Glutationa reduzida (GSH) (C) e a relação redox GSH/GSSG (D) no tecido hepático não diferiu ao final da lactação entre as ratas lactantes que consumiram PIS ou soja (Figura 14).

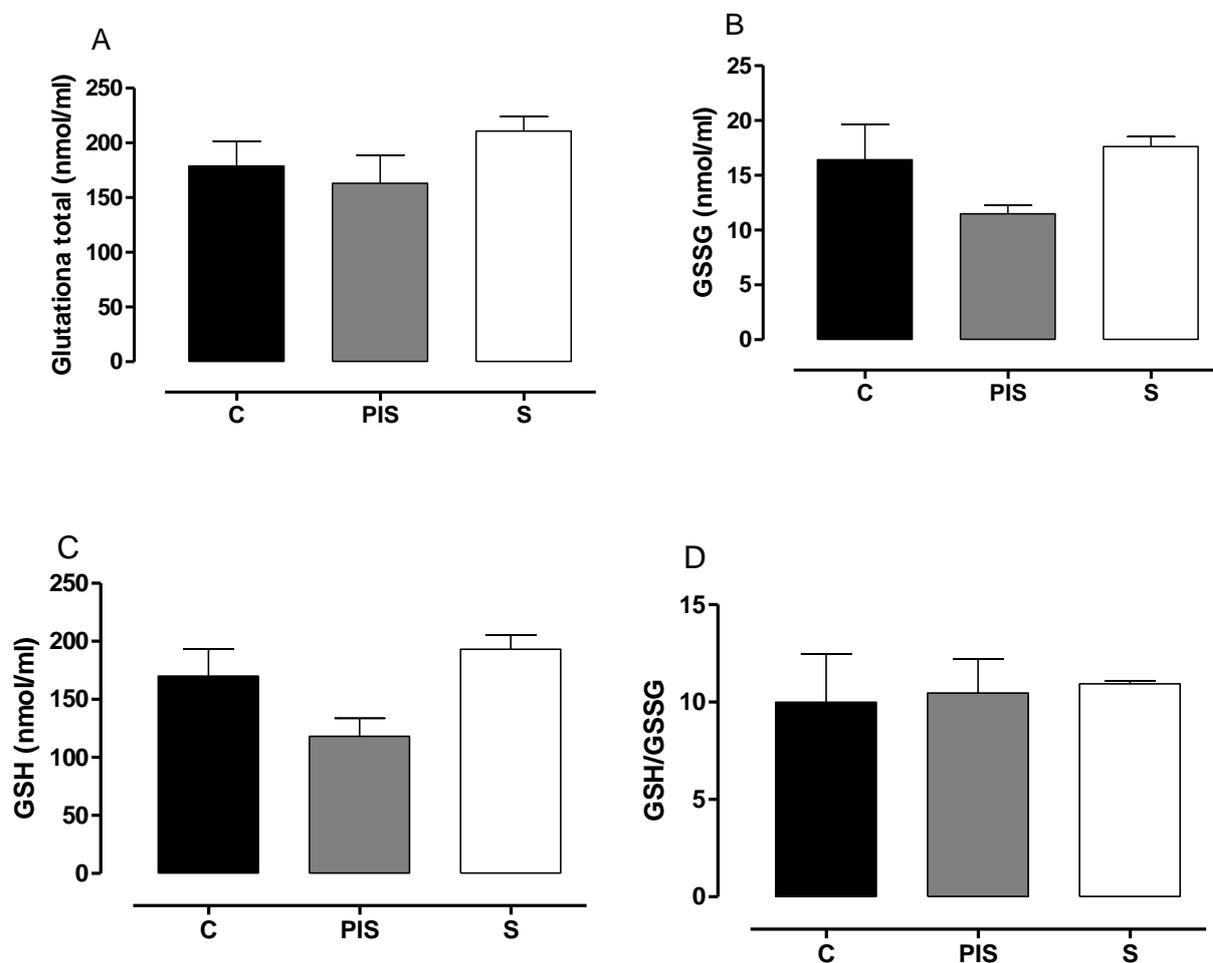


Figura 14: Níveis de glutathione total (A), oxidada (GSSH) (B), reduzida (GSH) (C) e relação redox GSH/GSSG (D) em homogenato hepático das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm.

Em relação à atividade das enzimas que compõe o sistema de defesa antioxidante endógeno, as ratas que consumiram soja durante a lactação apresentaram redução dos níveis de superóxido dismutase (SOD) hepática (Figura 15A) comparado

as mães dos grupos C e PIS (-26,04% e -22,10%; $p=0,0025$ respectivamente). Entretanto, apresentaram aumento dos níveis de catalase (CAT) (+29,12%; $p=0,0462$) quando comparado às ratas PIS (figura 15B). As enzimas glutaciona peroxidase (Figura 15C) e glutaciona redutase (Figura 15D) não diferiram entre os grupos.

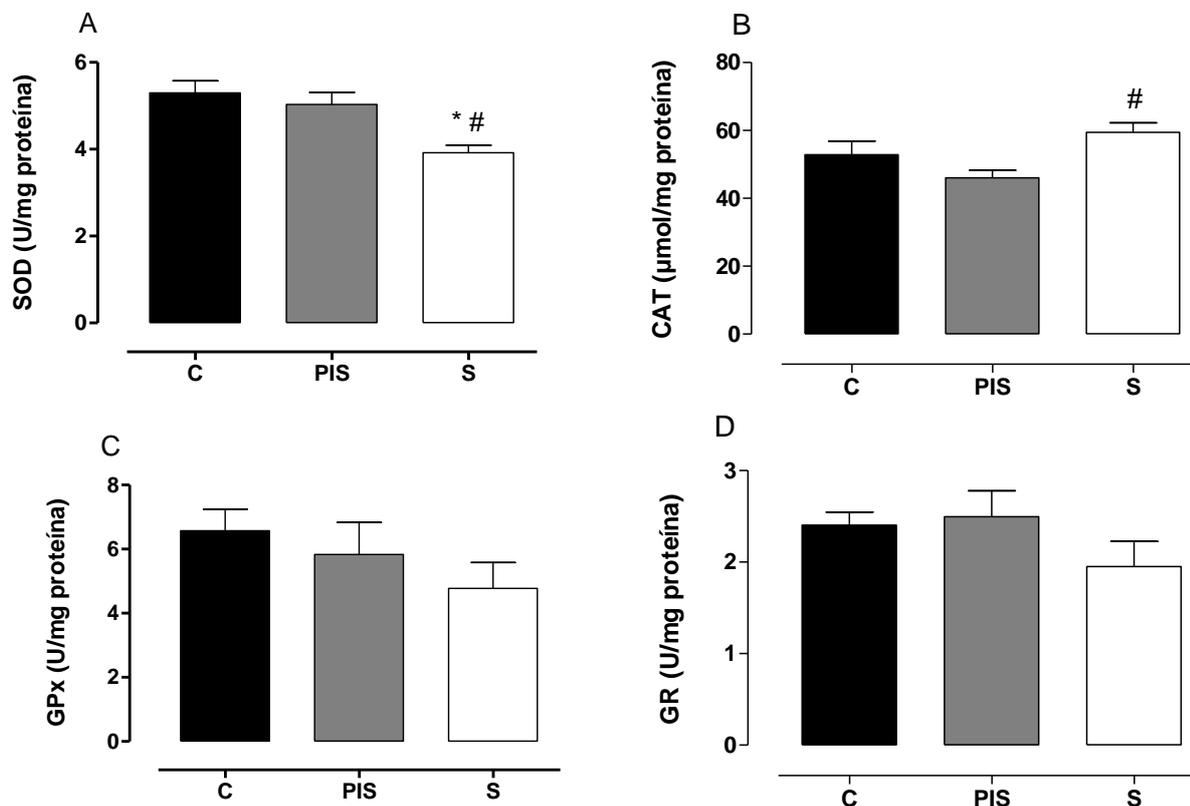


Figura 15: Níveis hepáticos das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutaciona peroxidase (C) e glutaciona redutase (D) das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p<0,05$ vs C. # $p<0,05$ vs PIS.

5.1.4. Avaliação da função adrenal

A ingestão de soja ou PIS na lactação não alteraram o conteúdo absoluto (Figura 16A) e relativo (Figura 16B) das catecolaminas na medula adrenal, nem o peso das glândulas das ratas ao final da lactação (C: $32,9\pm 2,22$ mg; PIS: $39,22\pm 4,26$ mg; S: $31,92\pm 6,49$ mg).

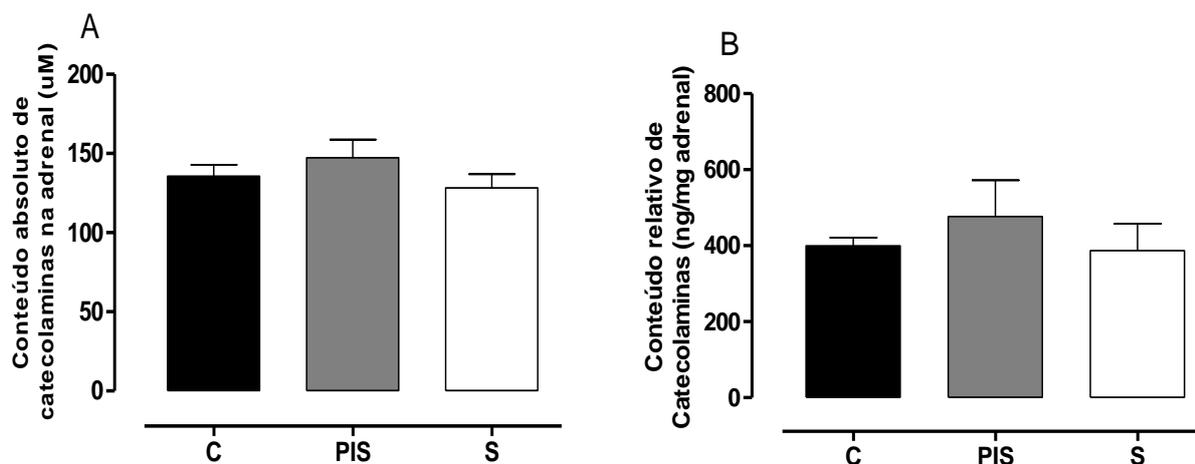


Figura 16: Conteúdo absoluto de catecolaminas na adrenal (A) e conteúdo relativo de catecolaminas pela massa da glândula adrenal (B) das mães que receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 8 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm.

5.2. EFEITOS DO CONSUMO MATERNO DE SOJA OU PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA DURANTE A LACTAÇÃO NA PROGÊNIE AO DESMAME E IDADE ADULTA

5.2.1. Estado nutricional

A figura 17 mostra a evolução da ingestão de ração e da massa corporal até os 150 dias de idade. A ingestão de ração foi menor na prole S comparada à prole PIS no dia 25 ($p= 0,0389$), nos demais dias não houve alteração do consumo entre as proles dos grupos C, PIS e S (Figura 17A). Em relação à massa corporal, houve diminuição do 7º ao 11º dia ($p<0,05$) na prole S comparada à prole C. Nos demais dias não houve alteração da massa corporal nos grupos experimentais (Figuras 17B e 17C).

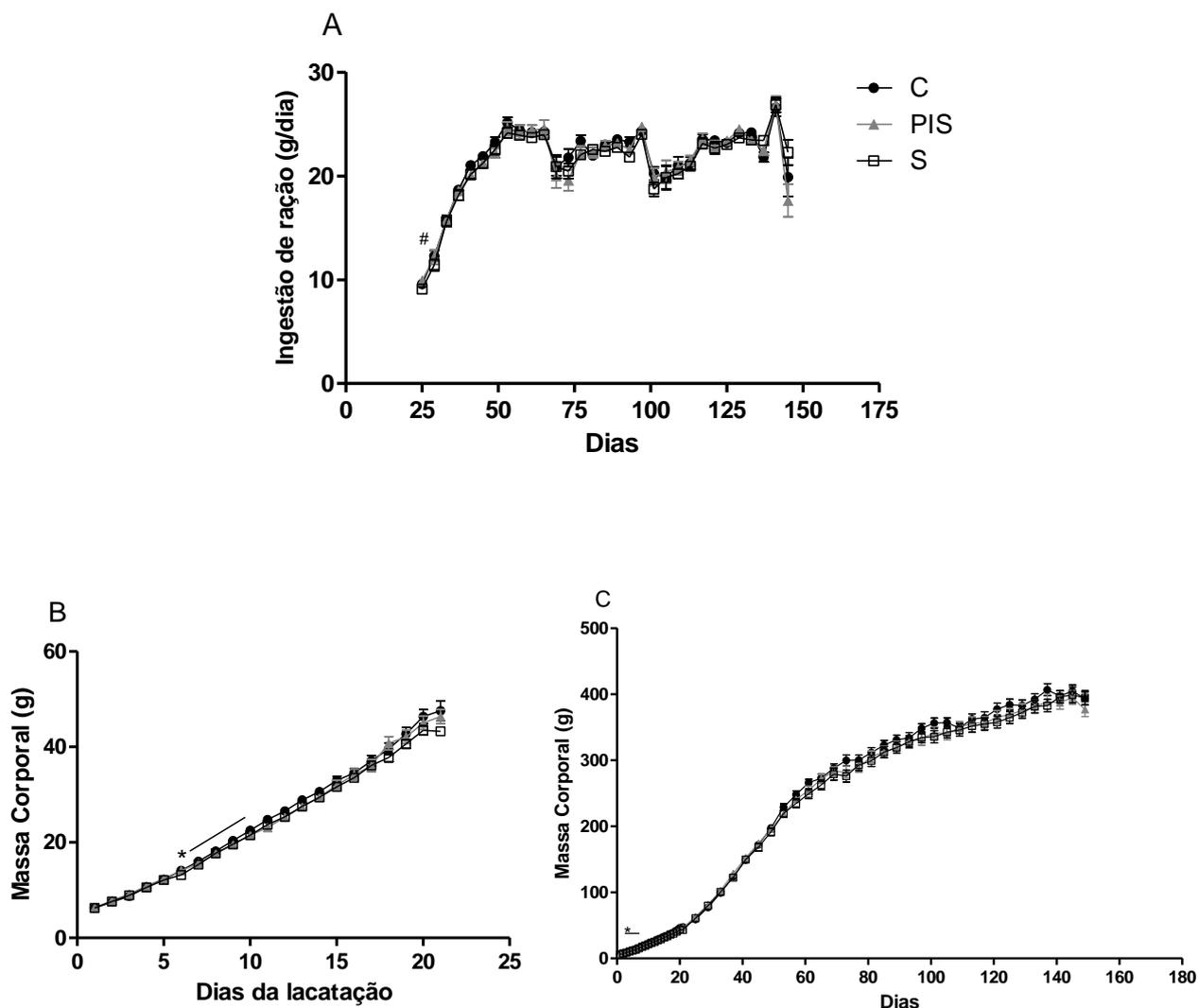


Figura 17: Consumo de ração (A) e massa corporal da prole durante a lactação (B) e até a vida adulta (C), cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 24 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs PIS.

5.2.2. Conteúdo hepático de colesterol e triglicerídeo (TG)

Aos 21 dias de idade, a prole PIS apresentou aumento do TG hepático (Figura 18A) comparado à prole C (+28,95%; $p = 0,0313$), já a prole S apresentou redução deste parâmetro comparado à prole PIS (-23,66%; $p = 0,0313$). Por outro lado, o colesterol hepático (Figura 18B) não foi alterado neste período. Na idade adulta (150

dias), observou-se maior colesterol hepático na prole PIS comparado ao grupo C (+82,97%; $p=0,0322$), e redução deste parâmetro na prole S em relação ao grupo PIS (-45,76%; $p=0,0322$). O TG hepático não foi alterado nesta idade.

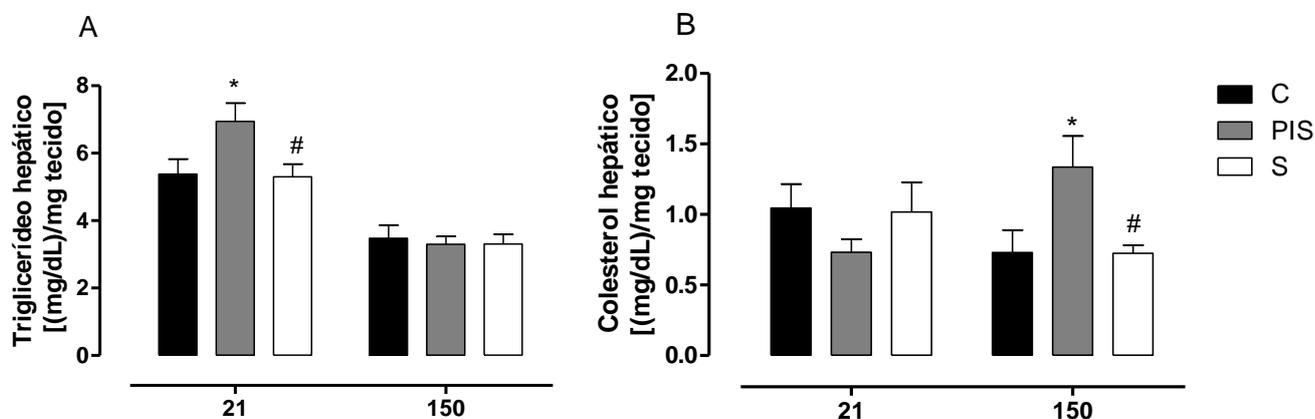


Figura 18: Níveis hepáticos de triglicerídeo (A) e colesterol total (B) das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p<0,05$ vs C. # $p<0,05$ vs PIS.

5.2.3. Índices de aterogenicidade

A tabela 3 apresenta os índices de aterogenicidade, que são utilizados para avaliar risco cardiovascular, das proles aos 21 e 150 dias de idade. Aos 21 dias de idade, ambas as proles cujas mães consumiram soja ou PIS na lactação apresentaram redução nos índices 1 (CT/HDL-c) (-22,02% e -27,36%; $p=0,0273$, respectivamente), 2 (LDL-c/HDL-c) (-28,3% e -34,62%, $p=0,0014$, respectivamente) e 3 [(colesterol total – HDL)/HDL] (-26,82% e -33,05%; $p=0,0273$, respectivamente). Já aos 150 dias de idade, a prole PIS apresentou maior índice 1 e 3 comparado à prole C (+57,72%, $p=0,0082$; +104,13%, $p=0,0082$, respectivamente) e a prole S mostrou menores valores de índice 1, 2 e 3 comparado à prole PIS (-41,2%, $p=0,0082$; -54%, $p=0,0293$ e -57,89%, $p=0,0082$; respectivamente).

Tabela 3: Índices de aterogenicidade das proles C, PIS e S aos 21 dias e 150 dias de idade.

	C	PIS	S
21 dias			
Índice 1	5,81±0,49	4,22±0,14*	4,52±0,41*
Índice 2	3,64±0,29	2,38±0,09*	2,61±0,15*
Índice 3	4,81±0,49	3,22±0,14*	3,52±0,41*
150 dias			
Índice 1	2,20±0,29	3,47±0,20*	2,04±0,37#
Índice 2	1,25±0,15	1,50±0,19	0,69±0,11#
Índice 3	1,21±0,23	2,47±0,20*	1,04±0,37#

Índice 1= CT/HDL-c; Índice 2= LDL-c/HDL-c; Índice 3= [(CT - HDL-c)/HDL-c]. C: controle caseína; PIS: proteína isolada de soja; S: soja. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais por grupo. Dados expressos como média ± epm * vs C; # vs PIS (p<0,05).

5.2.4. Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes no fígado

A figura 19 mostra que aos 21 de idade, as proles das ratas que consumiram soja durante a lactação apresentaram aumento de TBARS (vs. C: +127,27%, vs. PIS: +143,9%; p=0,0151). Aos 150 dias de idade somente as proles cujas mães receberam dieta PIS durante a lactação apresentaram redução de TBARS comparado às proles C (-39,82%; p=0,0103).

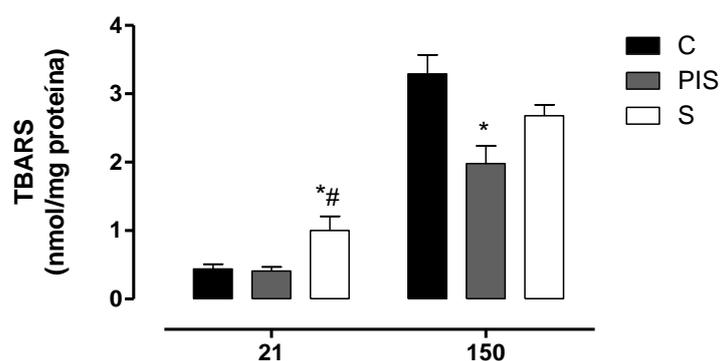


Figura 19: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenato das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. * p<0,05 vs C. # p<0,05 vs PIS

A figura 20 apresenta o teor hepático de glutathiona total (Figura 20A), glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 20B), glutathiona reduzida (GSH) (Figura 20C) e relação GSH/GSSG (Figura 20D) das proles aos 21 e 150 dias de idade. Pode-se observar que, aos 21 dias de idade, as proles S e PIS apresentaram redução da GSSG quando comparada à prole C (-22,09% e -33,97%; $p= 0,0017$, respectivamente), sem alterar a glutathiona total e a reduzida (GSH); a prole PIS também apresentou aumento da relação GSH/GSSG (vs. C: +39,44%, vs. S: +47,22%; $p=0,0053$). Aos 150 de idade não houve alteração desses parâmetros nos grupos experimentais.

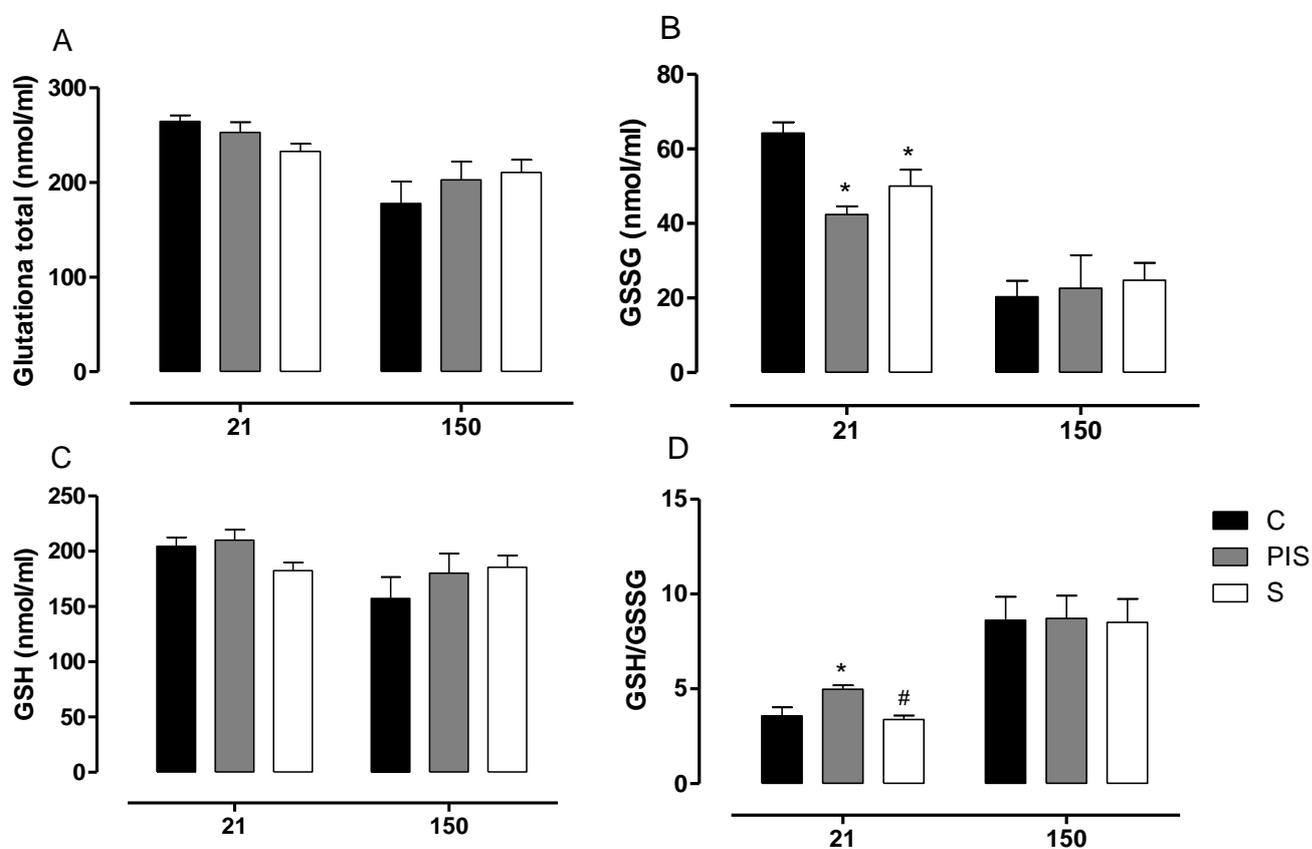


Figura 20: Níveis de glutathiona total (A), oxidada (GSSG) (B), reduzida (GSH) (C) e relação redox GSH/GSSG (D) em homogenato hepático das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs PIS.

Quando avaliada a atividade das enzimas que atuam na defesa antioxidante, foi observado que, ao desmame (21 de idade), as proles cujas mães consumiram soja na lactação apresentaram aumento da atividade hepática da superóxido dismutase (SOD) em relação as proles C e PIS (vs. C: +10,87% e vs. PIS: +9,18%; $p=0,039$, respectivamente) (Figura 21A) e também da glutathiona peroxidase (GPx) (+137,69%; $p=0,0125$) e glutathiona redutase (GR) (+33,01%; $p=0,0231$) quando comparada ao grupo controle (Figuras 21 C e D, respectivamente). Já a prole PIS apresentou aumento somente da atividade de GR em relação ao grupo C (+53,68%; $p=0,0231$) (Figura 21D). A catalase (CAT) não foi alterada neste período. Já aos 150 dias de idade, somente esta enzima apresentou alteração, estando aumentada na prole S (vs. C: +16,3%, vs. PIS: +17,55%; $p=0,0061$) (Figura 21B).

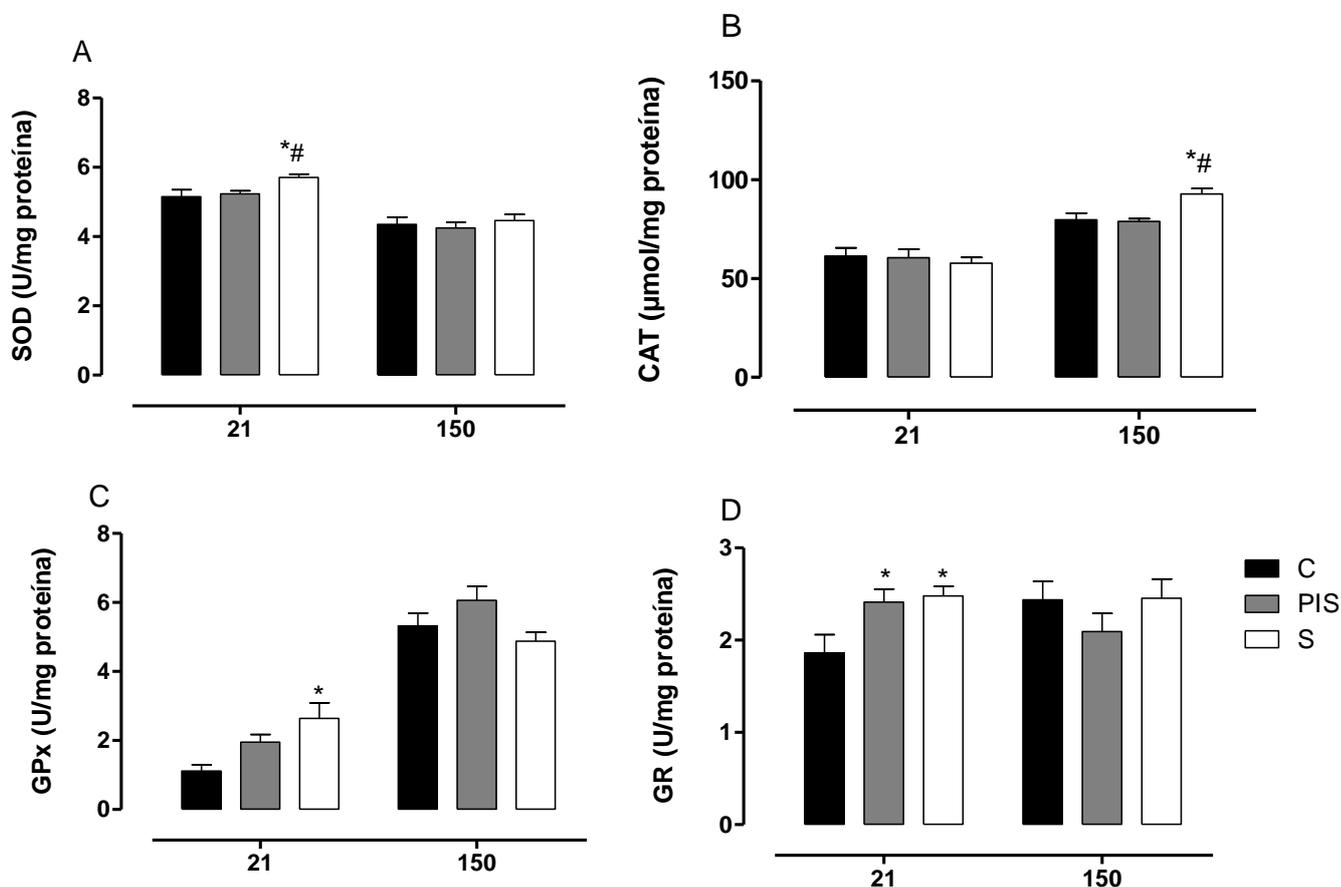


Figura 21: Níveis hepáticos das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), glutathiona peroxidase (GPx) (C) e glutathiona redutase (GR) (D) das proles aos 21 e 150 dias cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p<0,05$ vs C; # $p<0,05$ vs PIS.

5.2.5. Avaliação da função adrenal

O conteúdo de catecolaminas absoluto (Figura 22A) e relativo (Figura 22B) na glândula adrenal não foram alterados nas proles aos 21 dias. Entretanto, aos 150 dias de idade, observamos que o grupo PIS apresentou menor conteúdo absoluto (vs. C: -15,82%, vs. S: -14,68%; $p=0,0436$) e relativo (vs. C: -17,96%, vs. S: -29,45%; $p=0,0081$) de catecolaminas na adrenal.

Em ambos os períodos, a massa da adrenal não diferiu entre os grupos (21 dias - C: $10,03\pm 0,77$; PIS: $11,73\pm 0,54$; S: $11,74\pm 1,33$; 150 dias - C: $27,92\pm 0,60$; PIS: $27,68\pm 0,78$; S: $26,08\pm 1,93$).

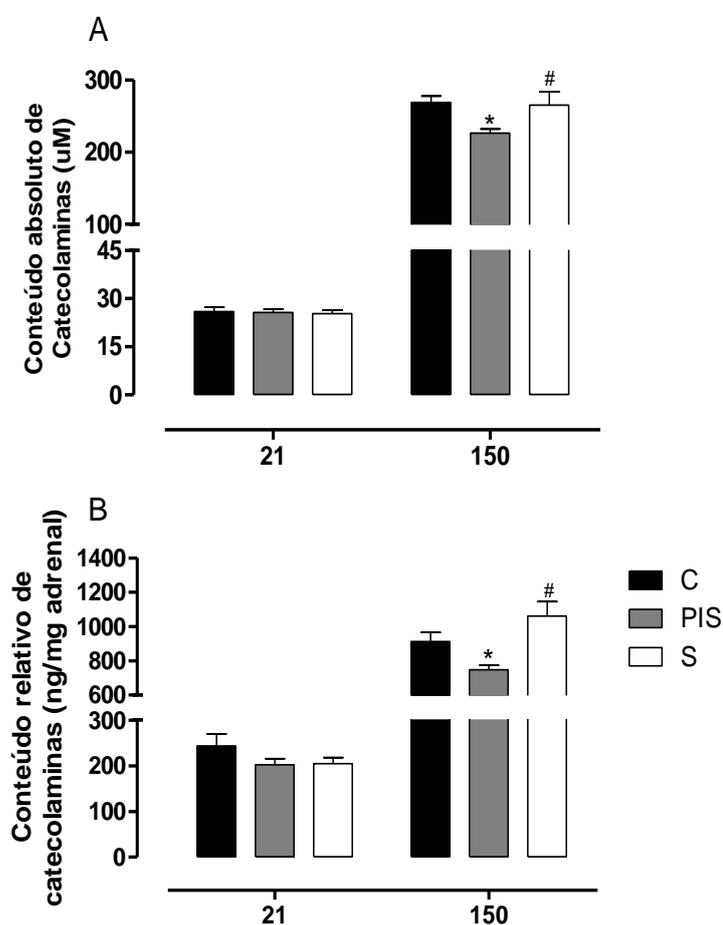


Figura 22: Conteúdo absoluto das catecolaminas na glândula adrenal (A), conteúdo relativo das catecolaminas pela massa da adrenal (B) das proles aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 8 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p<0,05$ vs C. # $p<0,05$ vs PIS.

A figura 23 exibe que não houve alteração na expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) entre os grupos experimentais na idade adulta (Figura 23A e 23B), o que reflete que a síntese de catecolaminas não está alterada, uma vez que a TH é a enzima limitante da biossíntese de catecolaminas.

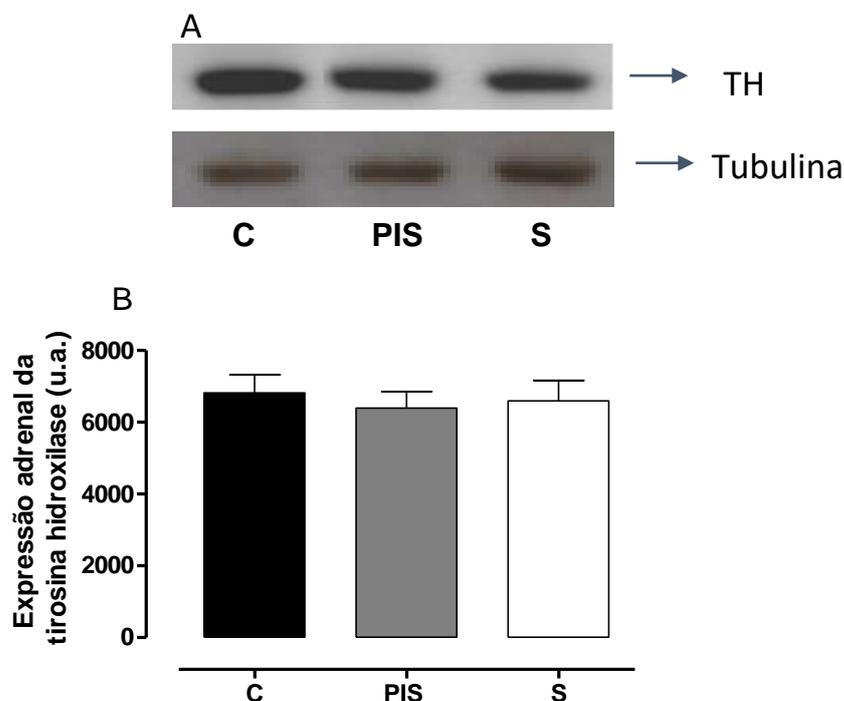


Figura 23: Expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) na medula adrenal da prole aos 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Estão ilustradas as bandas proteicas obtidas por Westen Blotting (A) e a densitometria está representada como unidades arbitrárias (B). Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm.

A secreção basal de catecolaminas é utilizada para avaliar se sem a presença do segretagogo há alteração da secreção de catecolaminas. Para isso, é utilizada a concentração de catecolaminas aos 15 minutos de estimulação (5º poço da secreção *in vitro*), pois até os 10 minutos (primeiros 4 poços) a glândula está se adaptando ao ambiente (ANDREAZZI et al., 2015). A figura 24 apresenta que o tratamento com S ou PIS durante a lactação não gerou alteração da secreção basal de catecolaminas pela medula adrenal das proles na vida adulta.

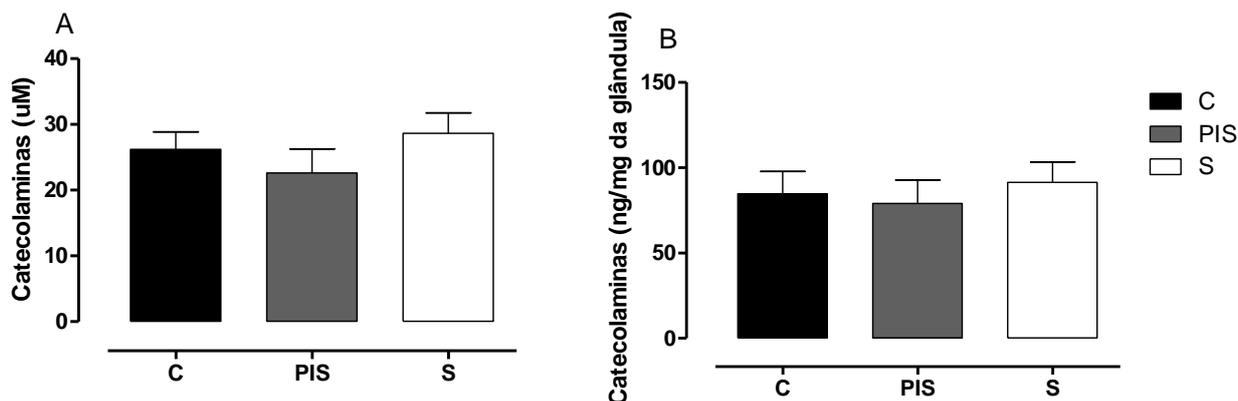


Figura 24: Secreção basal de catecolaminas em μM (A) e ng/mg da glândula (B) na medula adrenal da prole aos 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 30 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs PIS.

A figura 25 mostra que a prole cuja as mães consumiram PIS durante a lactação apresentaram, na idade adulta, maior secreção de catecolaminas pela medula adrenal quanto estimulada por cafeína (vs. C: +44,45%, vs. S: +79,18%; $p = 0,0070$). Entretanto, quando estimulada por potássio e carbamilcolina não houve alteração da secreção *in vitro* de catecolaminas pela medula adrenal dos grupos.

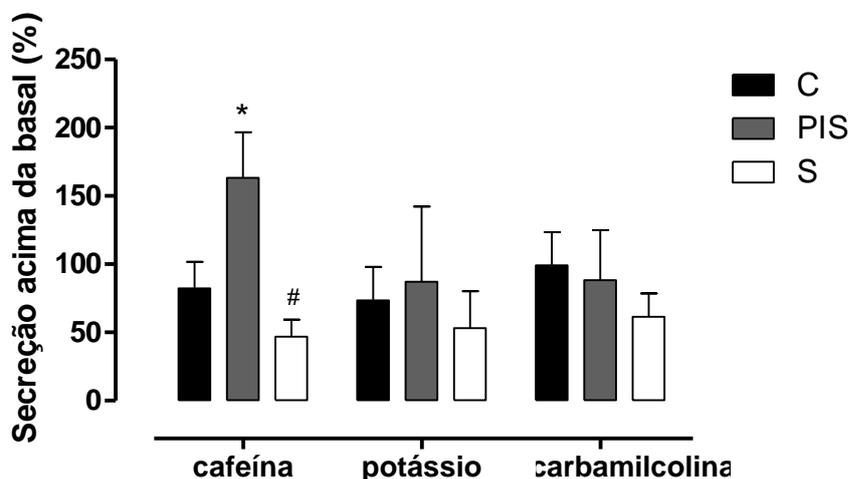


Figura 25: Catecolaminas secretadas *in vitro*. Secreção estimulada por 25mM de cafeína ou 30mM de potássio ou 50mM de carbamilcolina na medula adrenal da prole aos 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), proteína isolada de soja (PIS) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 10 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs PIS.

Tabela 4: Resumo dos resultados do consumo de S e PIS durante a lactação nas mães e proles aos 21 e 150 dias de idade.

	Mães PISxC	Mães SxC	Mães SxPIS	Prole 21 dias PISxC	Prole 21 dias SxC	Prole 21 dias SxPIS	Prole 150 dias PISxC	Prole 150 dias SxC	Prole 150 dias SxPIS
Ingestão Alimentar	↑ ^{18º dia}	↑ ^{18º dia}	-	-	-	-	-	-	↓ ^{25º dia}
17-β estradiol	-	↓	-						
MC	-	-	-	-	↓ ^{7º ao 11º dia}	-	-	-	-
CT/HDL	-	-	-	↓	↓	-	↑	-	↓
LDL/HDL	-	-	-	↓	↓	-	-	-	↓
(CT-HDL)/HDL	-	-	-	↓	↓	-	↑	-	↓
TG hepático				-	-	↓	↑	-	↓
Colesterol hepático				↑	-	-	-	-	-
TBARS	↓	-	-	-	↑	↑	↓	-	-
Glutationa Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSSG	-	-	-	↓	↓	-	-	-	-
GSH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSH/GSSG	-	-	-	↑	-	↓	-	-	-
SOD	-	↓	↓	-	↑	↑	-	-	-
CAT	-	-	↑	-	-	-	-	↑	↑
GPx	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
GR	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-
Catecolami na absoluta	-	-	-	-	-	-	↓	-	↑
Catecolami na relativa	-	-	-	-	-	-	↓	-	↑
TH							-	-	-
Secreção basal							-	-	-
Secreção Cafeína							↑	-	↓
Secreção Potássio							-	-	-
Secreção Carbamilcolina							-	-	-

MC: massa corporal; CT: colesterol total; LDL: colesterol LDL; HDL: colesterol HDL; TG: triglicerídeo; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; TH: tirosina hidroxilase; C: controle caseína; PIS: proteína isolada de soja; S: soja; ↑: ocorreu aumento; ↓: ocorreu diminuição; - : sem alteração.

6. DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo demonstram que o consumo de soja ou de sua proteína isolada durante a lactação promoveu alterações endócrino-metabólicas diferentes em suas proles, sendo observados, de forma geral, efeitos mais positivos quando o alimento soja foi consumido. De fato, tem sido relatado na literatura que os efeitos do consumo do alimento são capazes de trazer benefícios ao organismo que não são replicados quando há ingestão do nutriente ou componente bioativo de forma isolado (CERQUEIRA et al., 2007), o que corrobora e reforça resultados anteriores observado por nosso grupo neste modelo (VIEIRA, 2016; VIEIRA et al., 2018).

Foi evidenciado neste estudo, pela primeira vez, que o consumo materno de soja na lactação programou a progênie adulta para melhores índices de aterogenicidade e maior atividade da enzima antioxidante catalase sem alteração da função adrenal. Já o consumo de PIS na lactação programou a prole adulta para aumento dos índices de aterogenicidade 1 (CT/HDL-c) e 3 [(CT- HDL-c)/HDL-c], associado a maior colesterol hepático e diminuição do conteúdo de catecolaminas na adrenal devido à maior secreção. Embora não seja conhecido o impacto dessas alterações na saúde da progênie, é plausível que o consumo materno de soja na lactação tenha efeitos cardioprotetores em longo prazo, uma vez que os parâmetros avaliados neste estudo têm estreita relação com aspectos da fisiopatologia das DCV.

A base para a prevenção das DCV tem sido o controle dos fatores de risco cardiovascular modificáveis. Entre estes, é sabido que mudanças no padrão alimentar associados a um estilo de vida saudável podem ter grande impacto sobre a hipertensão arterial, dislipidemias e estresse oxidativo (BRASIL, 2007). Assim, estudos que avaliem os efeitos positivos de alimentos sobre estes parâmetros de risco cardiovascular são de grande interesse.

Nesse sentido, a soja tem sido bastante investigada. Esta leguminosa é considerada um Alimento Funcional desde 1999 pela FDA (*Food and Drugs Administration*) devido ao seu potencial terapêutico na prevenção de DCV (EMBRAPA, 2017). No Brasil em 2005, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), também incluiu a soja na lista de alimentos com capacidade funcional, e determinou que o consumo diário de 25 g de soja/dia é capaz de proteger contra o

desenvolvimento de DCV (BRASIL, 2005), atuando principalmente na melhora do perfil lipídico (SIMMEN et al., 2010; CHI et al., 2016; YAN et al., 2017) e antioxidante (BRIONES e TOUYZ, 2010; QIAN et al., 2012; YOON e PARQUE, 2014). No presente estudo estamos mostrando, que o consumo de soja na lactação modula fatores relacionados à DCV na prole adulta, sendo possível que exerça efeitos cardioprotetores futuros quando consumida em período crítico da vida.

Sabe-se que a exposição a diferentes fatores - nutricionais, hormonais e ambientais - em fases críticas da vida, como na lactação, podem promover mudanças estruturais, metabólicas e funcionais na prole, o que poderá gerar uma programação para a doença ou para a saúde (BARKER, 1998; MOURA e PASSOS, 2005; MOURA et al, 2008; ROSENFELD, 2017). De fato, estudo recente do nosso grupo demonstrou que o consumo materno de soja na lactação promoveu na prole adulta redução dos níveis de colesterol total e LDL-c, aumento do conteúdo mineral total e protegeu a prole de alterações no metabolismo glicídico (VIEIRA et al., 2018). Enquanto que o consumo materno de PIS programou para hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, além de redução na massa proteica corporal e conteúdo mineral total (VIEIRA, 2016).

Os fatores envolvidos nas alterações observadas neste modelo não são totalmente elucidados, porém tem sido sugerido que durante a lactação, pode ocorrer a transferência, via leite materno, de hormônios e/ou componentes da dieta materna para a prole, inclusive estradiol e isoflavonas da soja (FOSTER et al., 2002; JEFFERSON et al., 2012; JARRELL et al., 2012).

Desta forma, é possível que as diferentes alterações encontradas entre as proles S e PIS no estudo de Vieira (2016) e no presente estudo, estejam relacionadas, em parte, com a diferença na concentração de isoflavonas das dietas, e conseqüentemente, com a quantidade consumida deste flavonóide. A quantidade estimada de isoflavonas na dieta do grupo S é maior que a do grupo PIS, o que contribui para maior ingestão desses flavonoides pelas ratas lactantes S ($41,3 \pm 2,785$ mg/dia) em relação as ratas PIS ($9,87 \pm 2,039$ mg/dia), já que a ingestão alimentar é semelhante entre estas.

Corroborando os dados de Vieira (2016), o consumo de soja e sua proteína não alterou o estado nutricional materno e de suas proles ao desmame e na idade adulta. Foi evidenciada apenas redução pontual da massa corporal da prole S do 7º ao 11º dia da lactação. Esta alteração pode ter relação com a maior transferência de isoflavonas

e/ou estradiol via leite materno, para a prole neste período, uma vez que é sabido que tanto as isoflavonas como o estradiol atuam diminuindo a adipogênese e o acúmulo de gordura corporal (PARK et al., 2009; BROWN e CLEGG, 2010; YANG, 2012; PALACIOS-GONZÁLEZ et al., 2014). A transferência de 17 β -estradiol para a prole pode explicar em parte, a menor concentração sérica deste hormônio nas ratas que consumiram soja durante a lactação.

Neste estudo, foi determinado o risco cardiovascular a partir de alguns índices de aterogenicidade descritos na literatura. Estes índices que avaliam a correlação entre as frações de colesterol representam uma medida indicativa da propensão ao desenvolvimento de aterosclerose (CHOI et al., 1991; YANG et al., 2008). Não foi observado alterações nesses índices ao final da lactação (21 dias) nas ratas lactantes que consumiram dieta a base de S ou PIS. Por outro lado, ambas as proles dessas mães (S e PIS) apresentaram valores significativamente menores para todos os índices aterogênicos avaliados. Tal proteção para DCV observado ao desmame não foi refletida de forma igual na idade adulta (150 dias) para a prole PIS, uma vez que esta apresentou valor maior para os índices de aterogenicidade 1 (CT/HDL-c) e 3 (CT – HDL) / HDL) comparado ao controle. Já a prole S, mostrou menores valores em todos os índices comparado à prole PIS, se comportando de maneira semelhante aos animais do grupo C. Dessa forma, esses resultados indicam que o consumo materno de soja na lactação parece conferir um perfil de menor risco cardiovascular na progênie adulta, e por outro lado, o consumo de PIS de maior risco cardiovascular.

Sabe-se que o HDL-c diminui a expressão de moléculas de adesão e promove o efluxo de colesterol inibindo a oxidação do LDL-c na artéria e prevenindo a aterosclerose (BRASIL, 2007; BARTER, 2013). Além disso, possui propriedades antioxidantes, antitrombóticas e anti-inflamatórias, que potencializam sua função cardioprotetora (FORTI e DIAMENT, 2006; BARTER, 2013). Portanto, quanto maiores os níveis de HDL-c, menores as relações CT/HDL-c, LDL-c/HDL-c e (CT-HDL-c)/HDL-c e maior o efeito protetor. Por outro lado, em estudo recente no nosso grupo (VIEIRA, 2016; VIEIRA et al., 2018) utilizando o mesmo modelo experimental, não foi evidenciado aumento desta lipoproteína (HDL-c) nas proles S e PIS, porém as frações de colesterol consideradas como de risco é que apresentaram modificações, sendo evidenciada nos animais S adultos diminuição da fração LDL-c, enquanto na prole PIS se observou aumento de colesterol total associado a maior

TG séricos. Desta forma, os dados do presente estudo reforçam nossos dados anteriores de que o consumo materno de soja na lactação confere um perfil lipídico associado à proteção cardiometabólica, enquanto o de PIS um perfil de maior risco caridometabólico.

O fígado é o órgão responsável por exportar nutrientes, como os lipídeos, aos outros órgãos nas proporções necessárias, minimizando as alterações do metabolismo (NELSON e COX, 2011). Os resultados dos teores hepáticos de colesterol e TG reforçam os dados de perfil lipídico e índices de aterogenicidade evidenciados nos animais S e PIS. Foi observado que a prole PIS apresentou aumento do TG hepático aos 21 dias de idade e aumento do colesterol total hepático aos 150 dias de idade, enquanto a prole S manteve os níveis destes parâmetros semelhantes aos do controle, apresentando inclusive diminuição significativamente quando comparada a prole PIS.

Cabe mencionar que a repercussão do aumento de TG hepático aos 21 dias na prole PIS, não é determinado. Entretanto, embora este parâmetro não tenha sido alterado na idade adulta, não se pode descartar que ele seja um fator de *imprint* metabólico para o surgimento de algumas alterações metabólicas já evidenciadas anteriormente por nosso grupo nesses animais na idade adulta, como a hiperinsulinemia, hipercolesterolemia hipertrigliceridemia e resistência à insulina (VIEIRA, 2016).

Contrário ao observado por nós, Han et al (2017) mostraram que o consumo de PIS por ratas durante duas semanas antes do acasalamento, na gestação e na lactação não alterou as concentrações hepáticas de TG ou colesterol da prole, aos 21 dias de idade, além de menores níveis séricos de TG, ácidos graxos livres e HDL-c. Entretanto, observaram aumento de expressão de genes-alvo de PPAR e de adenosina 5' monofosfato proteína quinase (AMPK) no fígado da prole PIS. Eles associaram este efeito com a redução da lipogênese hepática, aumento da oxidação de ácidos graxos e aumento do catabolismo de ácido biliar. Concluem que o metabolismo lipídico alterado da prole pode ser atribuído à composição de aminoácidos da fonte dietética materna.

Os fatores envolvidos na maior proteção cardiometabólica conferida pelo consumo de soja, não estão totalmente estabelecidos, mas acreditamos que tenha relação com a maior transferência de isoflavonas pelo leite materno, já que as ratas soja tiveram um maior consumo de isoflavonas; além da possível maior passagem de estradiol pelo leite, uma vez que essas ratas apresentaram menor nível de 17 β -

estradiol no soro, o que corrobora para esta transferência via leite. E como já estão estabelecidos, ambos isoflavonas e estradiol, aumentam a expressão de diversos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, bem como aumentam a expressão dos receptores de LDL-c no fígado (MULLEN et al., 2004, PARK et al., 2009; FRIGOLET et al., 2009; BROWN e CLEGG, 2010; PALACIOS-GONZÁLEZ et al., 2014).

Mullen et al. (2004) evidenciaram que extrato de soja contendo isoflavonas ou as isoflavonas isoladas aumentam a forma madura de SREBP-2 (proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol) em células hepatocarcinomas humana, gerando aumento da expressão ou atividade do receptor LDL-c superficial o que, por sua vez, aumenta a depuração do colesterol no soro. Esses pesquisadores sugerem que as isoflavonas podem inibir a atividade da enzima HMG-CoA redutase (uma enzima da via metabólica que produz o colesterol e outros isoprenóides) com um efeito semelhante à estatina ou poderiam exercer seus efeitos diretamente na maturação do SREBP.

Além da redução da expressão dos SREBPs, estudos mostram que as isoflavonas da soja atuam nos receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs), regulando os genes da via lipogênica o que pode levar à transcrição de genes que codificam proteínas para a β -oxidação e para a dissipação de energia (PARK et al., 2009; FRIGOLET et al., 2009; PALACIOS-GONZÁLEZ et al., 2014). Assim, o teor de isoflavonas da dieta S pode ser responsável pela manutenção dos níveis de colesterol e triglicerídeos hepáticos da prole S, apesar de suas mães terem consumido maior teor de gordura, proveniente da ração, durante a lactação. Além disso, o percentual de carboidrato da dieta S é um pouco menor que as dos grupos C e PIS, o que pode também contribuir em parte para a redução dos níveis de TG hepático na prole S, comparada à prole PIS.

Desta forma, como na prole PIS é sugerido menor passagem de isoflavonas que na soja, é possível que esse controle da depuração de colesterol e regulação da síntese de colesterol possa está alterado nos animais PIS. É necessário avaliar futuramente esses fatores neste modelo para se compreender os fatores envolvidos nessas alterações no metabolismo lipídico e acúmulo de colesterol hepático nesses animais.

Neste estudo foram avaliados também parâmetros do estresse oxidativo e resposta antioxidante, já que a soja apresenta propriedades antioxidantes, e essa

ação pode ter relação com seus efeitos cardioprotetores (BARBOSA et al., 2006; ERBA et al., 2012; JAVANBAKHT et al., 2014). De forma geral, foi evidenciado que o consumo de soja e PIS promove alterações diferentes nesses parâmetros.

Um dos biomarcadores de estresse oxidativo que foi avaliado neste estudo foi o nível de TBARS, que é utilizado como indicador de peroxidação lipídica. Foi evidenciado ao final da lactação, que as mães PIS apresentaram redução de TBARS, sem alterar os níveis das enzimas antioxidantes assim como das glutatônicas. As mães S, por outro lado, não alteraram os níveis de TBARS e as formas de glutatônicas, mas apresentaram diminuição da SOD (vs. C e PIS) e aumento da CAT (vs. PIS), sem alteração nas demais enzimas antioxidantes.

Já foi demonstrado que o estradiol é um hormônio que aumenta os níveis de enzimas antioxidantes no organismo (MARTINS, 2003; LIMA et al., 2007). Visto que as mães que consumiram soja durante a lactação apresentaram menor teor de estradiol sanguíneo, a redução dos níveis de SOD nessas pode estar relacionada diretamente com a diminuição desse hormônio, embora isso não se aplique a CAT, uma vez que esta apresenta-se aumentada. Não descartamos que o maior teor de isoflavonas na dieta soja, e a consequente maior ingestão deste flavonóide, contrabalança os efeitos do estradiol.

A prole das mães que consumiram soja na lactação apresentou ao desmame (21 dias) aumento de TBARS comparado às proles C e PIS, associado a maior atividade das enzimas antioxidantes SOD (vs. PIS e C), GPx e GR (vs. C) e redução da glutatônica oxidada (vs. C). Esses dados permitem inferir que a prole S responde a maior peroxidação lipídica, aumentando a atividade das enzimas de defesa antioxidante.

Considerando a hipótese de que o estradiol tenha sido transferido da mãe S para a sua prole via leite materno, é possível que a maior concentração de estradiol nessa fase esteja modulando positivamente a SOD na prole S, aumentando sua concentração. Da mesma forma, a transferência de isoflavonas da soja também podem estar relacionadas com esse desfecho.

Não está determinado o fator relacionado ao aumento de TBARS nesses animais. Estudo recente do nosso grupo evidenciou que esses animais apresentam aumento de TG associado à hiperleptinemia ao desmame (VIEIRA et al., 2018), e como já está descrito na literatura que a peroxidação lipídica tem forte correlação positiva com a hipertrigliceridemia (GIACOMINI et al., 2013), é plausível que esta esteja contribuindo para o aumento da peroxidação lipídica na prole S.

Aos 21 dias de idade, a prole PIS não alterou o nível de TBARS e apresentou aumento da enzima glutathione redutase (GR) e redução da glutathione oxidada (GSSG) que contribuiu para maior relação entre a glutathione reduzida pela oxidada (GSH/GSSG), o que indica menor estresse oxidativo nesses animais neste período.

Analisando o ciclo da glutathione, pode-se observar que o aumento da relação GSH/GSSG presente na prole PIS aos 21 dias de idade é decorrente do aumento da atividade de GR, pois ela transforma a glutathione oxidada em reduzida, diminuindo assim a concentração de GSSG. Apesar da prole S apresentar redução da concentração de glutathione oxidada devido ao aumento de GR, ela também apresenta aumento da atividade de GPx, fazendo com que a relação GSH/GSSG não se altere.

Estudos mostram que as isoflavonas da soja parecem ter ação na eliminação de radicais livres, ajudando no controle do estresse oxidativo (BARBOSA, 2006; BLAY, 2010). No presente estudo a prole adulta das mães que consumiram soja durante a lactação apresentaram níveis normais da atividade de SOD, GPx e GR hepáticas, com aumento significativo da atividade da CAT, comparado as proles C e PIS, e ainda não apresentaram alteração no TBARS. O aumento de SOD ao desmame na prole S pode ter programado o aumento da atividade de CAT na idade adulta, visando reduzir os níveis de H₂O₂ no organismo, minimizando assim o estresse oxidativo. É possível que esses fatores estejam associados a uma defesa antioxidante aprimorada devido à presença de isoflavonas no início da vida destes animais.

Semelhante ao observado nas mães que consumiram PIS na lactação, a prole PIS adulta apresentou redução de TBARS, ou seja, menor peroxidação lipídica, sem alterar as enzimas antioxidantes e as concentrações de glutathiones. Anteriormente Vieira (2016), usando o mesmo modelo experimental, evidenciou que esses animais foram programados para hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, que são fatores, como já citado anteriormente, que tem correlação positiva com a peroxidação lipídica. Portanto, os resultados observados na idade adulta nos animais PIS, sugerem que outros mecanismos de neutralização de radicais livres não-enzimático, como por exemplo agentes quelantes de metais, sequestradores do H₂O₂ e doadores de elétrons, estejam atuando. O perfil de aminoácidos presentes na PIS e/ou sua concentração de isoflavonas podem ser fatores associados à eficiência desses mecanismos não-enzimáticos.

Estudos que avaliam atividade antioxidante da soja e sua proteína com programação metabólica são escassos. Yoon et al (2017) observaram que as proles das ratas que consomem baixo teor de PIS (10%) durante a gestação e lactação apresentam, aos 21 dias de idade, atividades de CAT e GPx maiores comparadas às proles cujas mães consumiram dieta com teor proteico de 20% de PIS. Estes animais não apresentaram alterações dos demais indicadores do estresse oxidativo, incluindo glutathiona total, GR e TBARS. Embora estes dados não possam ser comparados com os do presente estudo, pois tratamos as mães somente no período da lactação, observa-se que a quantidade de proteína de soja é outro fator que pode influenciar na resposta antioxidante.

Quando se trata de efeitos na resposta antioxidante da soja, PIS e isoflavonas mesmo em estudos que não utilizaram modelos de programação, não há consenso, uma vez que alguns estudos apresentaram resultados positivos em relação ao potencial antioxidante e redução do estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2006; ERBA et al., 2012; JAVANBAKHT et al., 2014), e outros nenhum ou pouco efeito sobre esses parâmetros (VEGA-LOPEZ, 2005; BARBOSA, 2006; SCHRADER et al., 2012)

As diferenças encontradas nos estudos podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como: metabolismo das isoflavonas que podem sofrer alterações dependendo da composição e atividade da microbiota intestinal, a quantidade de hidratos de carbono da dieta, já que sua presença gera um aumento na produção de equol, o teor de isoflavona na soja ou sua proteína, o período de tratamento e a forma como a soja ou seus compostos se apresentam (BARBOSA et al., 2006; MAHMOUD, et al., 2014). Ressalta-se que há poucos estudos que tenham trabalhado especificamente com o alimento soja, como no presente estudo. A maioria avalia os efeitos da PIS ou isoflavona isolada.

Neste estudo também foi avaliado a função da medula adrenal, uma vez que a concentração de catecolaminas no organismo é outro fator que também tem correlação com DCV, e não há estudos *in vivo* avaliando os efeitos da soja e PIS sobre estas.

O consumo de soja ou PIS durante lactação não alterou o conteúdo relativo e absoluto de catecolaminas na medula adrenal nas ratas lactantes e de suas proles ao final da lactação. Não temos conhecimento de estudos semelhantes ao nosso. Entretanto, estudos *in vitro* demonstraram que a síntese e a secreção de

catecolaminas pela adrenal sofrem interferência da concentração da isoflavona. A daidzeína em baixas concentrações (0,01-1,0 μM) estimulou a síntese e secreção de catecolaminas nas células medulares adrenais de bovinos, mas em altas concentrações (1, 10 e 100 μM) a daidzeína reduziu significativamente a secreção de catecolaminas quando induzida pela acetilcolina nessas células (LIU et al., 2007; YANAGIHARA et al., 2008). Desta forma, é possível que a quantidade de isoflavona biodisponível nas ratas S e PIS, não foi capaz de alterar a síntese de catecolaminas na adrenal.

Outra questão importante que pode influenciar nos resultados encontrados, é que os estudos *in vitro* trabalharam com a daidzeína isolada, e na soja e PIS, temos todas as formas de isoflavonas, tendo uma concentração maior de genisteína do que daidzeína (MAHMOUD et al., 2014; MELINA et al., 2016).

Na idade adulta, por outro lado, foi observado que a prole cujas ratas consumiram PIS durante a lactação apresentou menor conteúdo absoluto e relativo das catecolaminas comparado ao controle e ao grupo S. Já a prole das ratas que consumiram S durante a lactação não apresentaram alterações no conteúdo absoluto e relativo de catecolaminas na medula adrenal.

Para testar se a alteração no conteúdo de catecolaminas na medula adrenal estava relacionada com alterações na síntese ou na secreção de catecolaminas pela adrenal, foram avaliadas a expressão da enzima TH, e a secreção *in vitro* de catecolaminas pela adrenal por estímulos exógenos, conhecidos como tendo essa ação (carbamilcolina, potássio e cafeína).

A TH é a enzima limitante na via de biossíntese das catecolaminas na medula adrenal. Ela apresenta um controle rigoroso devido à importância fisiológica das catecolaminas no organismo. No presente trabalho não foram observadas alterações na expressão da TH na glândula adrenal das proles S e PIS na idade adulta. Estes dados indicam que a alteração observada no conteúdo de catecolaminas nos animais PIS, não estão relacionadas a mudanças na síntese de catecolaminas na adrenal, ou seja, o menor conteúdo de catecolaminas na prole PIS não é devido a menor síntese dessas.

Desta forma, foi avaliado então, a secreção de catecolaminas pela adrenal nestes animais adultos. Foi evidenciado maior secreção de catecolaminas pela adrenal na prole PIS quando estimulada pela cafeína. Esses dados mostram que esses animais parecem apresentar maior estímulo para a secreção de

catecolaminas, o que pode estar associado ao menor conteúdo destas na adrenal. A cafeína é um potente mobilizador de cálcio dos estoques intracelulares (retículo endoplasmático) (GARCIA et al., 2006). Cabe mencionar, que somente o estimulador cafeína promoveu maior secreção de catecolaminas. Esse resultado demonstra que, de alguma forma, a programação com PIS afeta os *pools* intracelulares de cálcio.

Os resultados de conteúdo, síntese e secreção de catecolaminas adrenais da prole S adulta demonstraram que o consumo materno de soja durante a lactação não gerou alterações na função adrenal da progênie, como evidenciado na prole PIS aos 150 dias. Esses resultados influem que a PIS, ao contrário da soja, gerou uma programação de maior alteração em pontos-chaves do metabolismo de catecolaminas.

Não conhecemos os fatores envolvidos nas alterações da função adrenal evidenciadas na prole PIS na idade adulta. Entretanto, é possível sugerir que a provável transferência de isoflavonas pelo leite materno explique em parte, os resultados encontrados. Sabe-se que o estradiol aumenta os níveis de cálcio intracelular por mobilização do retículo endoplasmático (REVANKAR et al., 2005; NILSSON et al., 2011), portanto, um maior teor de estradiol deveria gerar aumento do Ca^{2+} citosólico e assim, maior secreção de catecolaminas. A mãe PIS não apresentou alteração no estradiol sérico, e, além disso, apresentou consumo de isoflavonas cerca de 1/4 menor que as mães S. Assim, o baixo teor de isoflavonas proveniente da dieta, associado a níveis normais de estradiol na prole PIS, podem estar contribuindo para que a isoflavonas exerçam efeito agonista ao estradiol, intensificando seu efeito na mobilização do Ca^{2+} do retículo plasmático, programando assim, aumento da secreção de catecolaminas.

Entretanto, as mães S apresentaram redução do estradiol e receberam alto teor de isoflavonas durante a lactação, o que pode ter interferido na ação deste hormônio a partir da competição pelos sítios de ligação, exercendo efeito antagônico. Desta forma, a interação entre a concentração de estradiol e alto teor de isoflavonas na dieta S pode ter programado a prole adulta para normalização do Ca^{2+} citosólico, não interferindo na secreção de catecolaminas.

O impacto das alterações observadas na função da medula adrenal neste estudo não é conhecido, e não foram realizados ainda outros estudos *in vivo* avaliando o efeito do consumo de soja ou de seus componentes sobre a função

desta glândula, o que dificulta a interpretação desses resultados. Entretanto, é conhecido que o aumento descontrolado da secreção das catecolaminas pela adrenal pode gerar crise hipertensiva, arritmias e danos no miocárdio, além de alterações em vários parâmetros metabólicos (GARCIA et al., 2006; DIEGO et al, 2008; MOURÃO JR e ABRANMOV, 2011; TEKIN et al, 2014). Portanto, a manutenção de níveis adequados desses hormônios é fundamental para manutenção da pressão arterial normal, da homeostase cardiovascular e melhor adaptação a eventos estressantes.

Desta forma, avaliando sob a ótica de risco cardiovascular, a prole S parece apresentar um perfil de menor risco em relação a prole PIS, que secreta maior quantidade de catecolaminas.

É importante salientar que as análises de catecolaminas são extremamente sensíveis e apresentam grande diferença no resultado de cada animal, sendo necessária a utilização de um maior número de glândulas para que os resultados sejam válidos. No presente estudo, apesar de termos usado um número de animais considerado adequado para esta análise, observamos algumas variações, em especial da avaliação da secreção *in vitro*.

Os resultados encontrados neste estudo, de certa forma reforçam as diretrizes atuais de alimentação saudável e do Guia Alimentar para a População Brasileira (2014), na medida em que sugere que o consumo do próprio alimento, sem processamento (*in natura*) apresenta efeitos mais positivos sobre a saúde cardiometabólica. É necessário mencionar que não é somente um alimento que terá efeito sobre a saúde, mas sim um conjunto de mudanças no estilo de vida como um todo. Além disso, o consumo em excesso de qualquer alimento pode ser prejudicial.

Desta forma, o consumo de soja em fases críticas da vida deve ser em equilíbrio com outros alimentos, não se tendo ainda um consenso sobre a quantidade que deve ser consumida para se ter efeitos positivos e se o seu consumo é seguro nas fases iniciais da vida, já que há estudos também mostrando efeitos negativos do seu consumo sobre outros parâmetros, como sistema reprodutor (RUHLEN et al., 2008). Desta forma, a realização de mais estudos sobre a temática é necessária, em especial nessas fases críticas do desenvolvimento, já que há poucos estudos em modelos animais e nenhum identificado em seres humanos, visto que a maioria dos estudos em humanos avaliam os efeitos do consumo de soja em fases tardias da vida (menopausa).

Cabe mencionar que este estudo apresenta limitações que precisam ser consideradas, como a não realização da quantificação das isoflavonas nas dietas e estradiol no leite, avaliação de outros parâmetros do metabolismo lipídico, bem como a utilização de outros parâmetros que avaliem risco cardiovascular. Essas análises seriam interessantes para complementar e reforçar a discussão dos resultados encontrados.

7. CONCLUSÃO

O consumo de soja ou de sua proteína isolada por ratas durante a lactação programou alterações diferentes nos mecanismos relacionados com a cardioproteção da progênie. O consumo materno de soja na lactação programou a progênie adulta para melhores índices de aterogenicidade, maior atividade da enzima antioxidante catalase e não alteração da função da medula adrenal. Já o consumo de PIS na lactação programou para aumento em dois dos índices de aterogenicidade [CT/HDL-c e (CT-HDL-c)/HDL-c], associado a maior colesterol hepático e diminuição do conteúdo de catecolaminas na adrenal devido à maior secreção. Embora não seja conhecido o impacto dessas alterações na saúde da progênie, é plausível que o consumo materno de soja na lactação tenha efeitos cardioprotetores em longo prazo, uma vez que os parâmetros avaliados neste estudo têm estreita relação com aspectos da fisiopatologia das doenças DCV.

É sugerido que as diferenças encontradas neste estudo podem ser justificadas pelo teor de isoflavonas presente em cada dieta materna e também pelo alimento conter diversos componentes que a proteína isolada não apresenta. As diversas substâncias bioativas/nutrientes presentes na soja podem ser responsáveis por acarretar um efeito sinérgico no organismo, gerando um desfecho benéfico, não observado quando consumida a proteína isolada de soja.

8. REFERÊNCIAS

AE PARK, S. et al. Genestein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzymes activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci*, v. 79, p. 1207-1213, 2006.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

AJDZANOVIC, V. et al. Membrane Steroid Receptor-Mediated Action of Soy Isoflavones: Tip of the Iceberg. *The Journal of Membrane Biology*, v. 248, n. 1, p. 1–6, 2015.

ANDREAZZI, A.E. et al. Early Glycine Supplementation Re-Establishes Adrenal Catecholamine Secretion in Hypothalamic Obesity Model in Rats but does not Affect Visceral Adiposity. *Journal of Glycomics and Metabolism*, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2015.

ALI, A.A. et al. Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes. *J. Nut. Biochem*, v. 16, p. 693-699, 2005.

ALLRED, C.D. et al. Soy processing affects metabolism and disposition of dietary isoflavones in ovariectomized Balb/c mice. *Journal of agricultural and food chemistry* v. 53, n. 22, p. 8542-8550, 2005.

ANDRES, A. et al. Compared with feeding infants breast milk or cow-milk formula, soy formula feeding does not affect subsequent reproductive organ size at 5 years of age. *J Nutr*, v. 145, n. 5, p.871-5, 2015.

AOYAMA, T. et al. Effect of soy and milk whey protein isolates and their hydrolysates on weight reduction in genetically obese mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, v. 64, p. 2595-2600, 2000.

ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; MARINO, M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med*, v. 27, p. 299-402, 2006.

Association of official analytical chemists (AOAC): *Official Methods of Analysis*; 14a ed., 1984.

AZZI, A. Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochem Biophys Res Commun*. v. 362, n. 2, p. 230–232, 2007.

Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Acesso em 21/02/17. Disponível em>> [<<http://bcrj.org.br/catalogo/cell/?celula=0071](http://bcrj.org.br/catalogo/cell/?celula=0071)

BARBOSA, A.C.L. et al. Isoflavone content and profile and antioxidant activity of soy and soy products. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 26, n. 4, 2006.

BARBOSA, A.C.L.; LAJOTO, F.M.; GENOVESE, M.I. Effect of free or protein-associated soyisoflavones on the antioxidant status in rats. *J Sci Food Agric*, v. 91, p. 721–731, 2011.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, v. 23, n. 4, 2010.

BARKER, D.J. In útero programming of chronic disease. *ClinSci (Lond)*, v. 95, n. 2, p. 115-28, 1998.

BARNES, S. The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and their Food Products. *Lymphat Res Biol.*, v. 8, n. 1, p. 89-98, 2010.

BARTER, P.J. High Density Lipoprotein: A Therapeutic Target in Type 2 Diabetes. *Endocrinol Metab*, v. 28, n. 3, p. 169-177, 2013.

BAZZOLI, D.L.; HILL, S.; DISILVESTRO, R.A. Soy protein antioxidant actions in active, young adult women. *Nutrition Research*, v. 22, p. 807–815, 2002.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Bioquímica. 7ª edição. Ed. Guanabara Koogan. 2012.

BERNARDO, B.D. et al. Genistein reduces the noxious effects of in utero bisphenol A exposure on the rat prostate gland at weaning and in adulthood. *Food and Chemical Toxicology*, v. 84, p. 64–73, 2015.

BETANCOURT, A. et al. Alterations in the Rat Serum Proteome Induced by Prepubertal Exposure to Bisphenol A and Genistein. *J Proteome Res*, v. 13, n. 3, p. 1502–1514, 2014.

BHATHENA, S.J.; VELASQUEZ, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr*, v. 76, p.1191-1201, 2002.

BIANCO, A.C. Hormônios Tireóideos, UCPs e Termogênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 44, n. 4, 2000.

BLAY, M. et al. J. Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, n. 2, p. 382–390, 2010.

BOYDA, R.M. et al. Peripheral adrenoceptors: the impetus behind glucose dysregulation and insulin resistance. *J. Neuroendocrinol.*, v. 25, p. 217–228, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Volume 88, Suplemento I, 2007. Disponível em: >>http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2013/V_Diretriz_Brasileira_de_Dislipidemia_s.pdf<< Acesso em: 5 de maio de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: >><http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja><<. Acesso em: 17 de janeiro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, 2005 Disponível em >>http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm<<. Acesso em 31 de janeiro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em >>http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf<< Acesso em 30 de janeiro de 2017.

BRIONES, A.M.; TOUYZ, R.M. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Curr Hypertens*, v. 12, n. 2, p. 135-42, 2010.

BROWN, L.M.; CLEGG, D.J. Central effects of estradiol in the regulation of adiposity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 112, p. 65-73, 2010.

BROWN, N.M. et al. S(-) equol production is developmentally regulated and related to early diet composition. *Nutr Res*, v. 34, n. 5, p. 401–409, 2014.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, v. 52, n., p. 302-310, 1978.

CAMPBELL, D.G.; HARDIE, D.G.; VULLIET, P.R. Identification of Four Phosphorylation Sites in the N-terminal Region of Tyrosine Hydroxylase. *J Biol Chem*, v. 261, n. 23, p. 10489-92, 1986.

CAO, J. et al. Soy but not bisphenol A (BPA) or the phytoestrogen genistin alters developmental weight gain and food intake in pregnant rats and their offspring. *Reproductive Toxicology*, v. 58, p. 282-294, 2015.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. In: Alton, M. (Ed.). *Methods Enzymol: Academic Press*, v. 113, p. 484-490, 1985.

CAVALLINI, D.C.U.; ROSS, E.A. Equol: efeitos biológicos e importância clínica de um metabólito das isoflavonas. *Alim. Nutr.* v. 20, n. 4, p. 677-684, 2009.

CEDERROTH C.R.; NEF S. Fetal programming of adult glucose homeostasis in mice. *PLoS One*, v. 30, n. 4(9), p. 72-81, 2009.

CEDERROTH, C.R. et al. A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice. *Environ Health Perspect*, v. 115, n. 10, p. 1467-73, 2007.

CEDERROTH, C.R. et al. Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes*, v. 57, n. 5, p. 1176-85, 2008.

CEDERROTH, C.R. et al. Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. *Mol Cell Endocrinol*, v. 10, n. 321(2), p. 152-60, 2010.

CERQUEIRA, F. M.; GENNARI, M. H M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim Nova*, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHANDRASEKHARAN, S.; AGLI, A. Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *J Steroids Hormon Sci*, v. 12, 2013.

CHENG, S.Y. et al. The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women. *J. Women Health*, v.13, p. 1080-1086, 2004.

CHI, X.X. et al. Effects of isoflavones on lipid and apolipoprotein levels in patients with type 2 diabetes in Heilongjiang Province in China. *J Clin Biochem Nutr*, v. 59, n. 2, p. 134-138, 2016.

CHOI, J.S. et al. Hypolipemic and hypoglycemic activities of *Prunus davidiana* in high fatted rats. *Arch. Pharm. Res.*, v. 14, p. 44-7, 1991.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 7, p. 66-76, 1996.

CROSS, T.L. et al. Soy Improves Cardiometabolic Health and Cecal Microbiota in Female Low-Fit Rats. *Sci Rep*, v. 23, n.7, p. 926, 2017.

DAVIS, J. et al. Soy protein influences the development of the metabolic syndrome in male obese ZDFxSHHF rats. *Horm Metab Res*, v. 37, p. 316–25, 2005.

DIEGO, A.M.G.; GANDÍA, L.; GARCIA, A.G. A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medula. *Acta Physiol*, v. 192, p. 287–301, 2008.

DOERGE, D.R. et al. Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol*, v. 15, p. 105-110, 2001.

DOUGLAS, C.R. Fisiologia da glândula supra-renal. *Fisiologia aplicada à nutrição*. 2º ed. Guanabara Koogan, 2006.

DUNKLEY, P.R. et al. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem*, v. 91, p. 1025–1043, 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: >> <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos><<. Acesso em: 17 de janeiro de 2017.

ENDERMANN, D.; SCHIFFRIN, E. Endothelial Dysfunction. *The American Society of Nephology*, v. 15, p. 1983-1922, 2004.

ERBA, D. et al. Isoflavone supplementation reduces DNA oxidative damage and increases O-β-N-acetyl-D-glucosaminidase activity in healthy women. *Res Nutr*. v. 32, n. 4, p. 233-40, 2012.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.R. Os benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Rev. Nutr.*, v. 14, n. 1, 2001.

FERREIRA, B.R.; SOUZA, M.L.; MARTINZ, T.J.C. Via de Sinalização da Proteína G/Adenilato Ciclase. Universidade do Estado do Pará - CCB. 2015.

FIGUEIREDO, M.S. et al. Maternal Flaxseed Diet During Lactation Programs Thyroid Hormones Metabolism and Action in the Male Adult Offspring in Rats. *Horm Metab Res*, v. 43, n. 6, p. 410-6, 2011.

FILARDO, E. et al. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*, v. 148, p. 3236–3245, 2007.

FISHBECK, K.L.; RASMUSSEN, K.M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr*, v. 117, p. 1967-1975, 1987.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. *Federal Register*, v. 64, p. 57699-733, 1999.

Disponível em >><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11010706><< Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

FORTI; DIAMENT. Lipoproteínas de Alta Densidade: Aspectos Metabólicos, Clínicos, Epidemiológicos e de Intervenção Terapêutica. Atualização para os Clínicos. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, p. 672-679, 2006.

FOSTER, W.G. et al. Detection of phytoestrogens in samples of second trimester human amniotic fluid. *Toxicol Lett*, v. 129, p. 199–205, 2002.

FRANKE, A.A.; CUSTER, L.J.; TANAKA, Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am J Clin Nutr*, v. 68, p. 1466S–1473S, 1998.

FRANKENFELD, S.P. efeitos do treinamento em esteira em ratos obesos programados pela superalimentação pós-natal. 2009. Dissertação. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 2009.

FRIGOLET, M.E. et al. White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. *JNB*, v. 22, p. 118–129, 2009.

FURUSAWA, M.; TANAKA, T.; ITO, T. Antioxidant activities of hydroxyl flavonoids. *J. Health Sci*, v. 51, n. 3, p. 376-378, 2005.

GARCIA, A.G. et al. Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Physiol Rev*, v. 86, p. 1093–1131, 2006.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 20, p. 5987-5993, 2002.

GIACOMINI, M.M.; HAHN, S.; SIQUEIRA, L.O. Análise de correlação do perfil lipídico e dano oxidativo em pacientes diabéticos. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, v. 34, n. 2, p. 251-255, 2013.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; DELL'ORO, R. Sympathetic activation in obesity: a noninnocent bystander. *Hypertension*, v. 56, p. 338–340, 2010.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.

GU, L. et al. Isoflavone conjugates are underestimated in tissues using enzymatic hydrolysis. *J Agric Food Chem*, v. 53, p. 6858-6863, 2005.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 35, p. 1147-50, 2007.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, v. 142, n. 2, p. 231-5, 2004.

HAN, A.; WON, S.B.; KWON Y.H. Different Effects of Maternal Low-Isoflavone Soy Protein and Genistein Consumption on Hepatic Lipid Metabolism of 21-Day-Old Male Rat. Offspring. *Nutrients*, v. 9, n. 9, p. 1039, 2017.

HELDRING, N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Ver*, v. 87, p. 905-931, 2007.

HEMENAN, K.M. et al. Soy protein with and without isoflavones fails to substantially increase postprandial antioxidant capacity. *J Nutr Biochem.*, v. 18, n. 1, p. 46-53, 2007.

HERCBERG, S., et al. Background and rationale behind the SU.VI. MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. *International Journal for Vitamins and Nutrition Research*, v. 68, n. 1, p. 3- 20, 1998.

HOOKE, V. et al. Profiles of Secreted Neuropeptides and Catecholamines Illustrate Similarities and Differences in Response to Stimulation by Distinct Secretagogues. *Mol Cell Neurosci*, v. 68, p. 177–185, 2015.

HU, J.P. et al. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol. Trace Elem. Res*, v. 47, p. 327-331, 1995.

HU, Y.J. et al. Effect of dietary supplementation with glycitein during late pregnancy and lactation on antioxidative indices and performance of primiparous sows. *Journal of Animal Science*, v. 93, n. 5, p. 2246–2254, 2015.

HUGHES, G.J. et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: Criteria for evaluation. *J. Agric. Food Chem*, v. 59, p. 12707–12712, 2011.

HURLEY, C. et al. Soy protein isolate in the presence of cornstarch reduces body fat gain in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 76, p. 1000-1007, 1998.

JAHAN-MIHAN, A. et al. Soy protein–based compared with casein-based diets fed during pregnancy and lactation increase food intake increase food intake and characteristics of metabolic syndrome less in female than male rat offspring. *Nutr Res*, v. 31, p 644–651, 2011.

JARRELL, J.; FOSTER, W.G.; KINNIBURGH, D.W. Phytoestrogens in Human Pregnancy. *Obstet Gynecol Int*, v. 2012, p. 7, 2012.

JAVANBAKHT, M.H. et al. Soy protein and genistein improves renal antioxidant status in experimental nephrotic syndrome. *Nefrologia*, v. 34, n. 4, p. 483-90, 2014.

JEFFERSON, W. et al. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod*, v. 74, p.161–168, 2006.

JEFFERSON, W.N.; PATISAUL, H.B.; WILLIAMS, C.J. Reproductive Consequences of Developmental Phytoestrogen Exposure. *Reproduction*, v. 143, n. 3, p. 247–260, 2012.

JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, v. 4, n. 5, p. 1-11, 2005.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, v. 8, p. 1865-79, 2006.

JUNGBAUER, A.; MEDJAKOVIC, S. Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 139, p. 277-289, 2014.

KALUDJEROVIC, J.; WARD, W.E. Bone-specific gene expression patterns and whole bone tissue of female mice are programmed by early life exposure to soy isoflavones and folic acid. *J Nutr Biochem*, v. 26, n. 10, p. 1068-76, 2015.

KARR-LILIENTHAL, L.K. et al. Amino Acid, Carbohydrate, and Fat Composition of Soybean Meals Prepared at 55 Commercial U.S. Soybean Processing Plants. *J Agric. Food Chem*, v. 53, p. 2146-2150, 2005.

KELNER, K.L. et al. A comparison of trihydroxyindole and HPLC/electrochemical methods for catecholamines measurement in adrenal chromaffin cells. *Neurochem Int*, v. 7, p. 373–378. 1985.

KHAN, A.Q. et al. Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NF- κ B in Swiss albino mice. *Toxicology*, v. 302, p. 266–274, 2012.

KOSTELAC, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem*, v. 51, p. 7632–7635, 2003.

KUIPER, G.G. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, v. 139, p.4252–4263, 1998.

KUMAR, R. et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids*, v. 2011, p. 7, 2011.

KUMER, S.C.; VRANA, K.E. The intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochem.*, v. 67, p. 443–462, 1996.

LAMARTINIERE, C.A. et al. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J. Nutr*, v. 132, p. 552S–558S, 2002.

LAVIGNE, C.; MARETTE, A.; JACQUES, H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 278, p. 491-500, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios da Bioquímica de Lehninger*. 5ª edição. 2011.

LEHRAIKI, A. et al. Genistein impairs early testosterone production in fetal mouse testis via estrogen receptor alpha. *Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 1542–1547, 2011.

LI, X. et al. Ikarisoid A inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis by suppressing nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 388, n. 12, p. 1259-69, 2015

LI, Y. et al. Antioxidant Function of Isoflavone and 3,3'-Diindolylmethane: Are They Important for Cancer Prevention and Therapy? *Antioxidants & Redox Signaling*. June, v. 19, n. 2, p. 139-150. 2013.

LIMA, S.M.R.R. et al. Efeitos da suplementação do 17 β -estradiol no dano oxidativo cardíaco de ratas submetidas à privação dos hormônios ovarianos. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 29, n. 1, p. 27-33, 2007.

LIU M. et al. Dual effects of daidzein, a soy isoflavone, on catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *Endocrinology*, v. 148, n. 11, p. 5348-54, 2007.

LOTITO, S.B.; FREI, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 36, p. 201-211, 2004.

LOURENÇO, A.P., FORTUNATO, J.S. Glândulas supra-renais. *Princípios gerais da fisiologia endócrina* – UFF. 2005. Disponível em: >> <http://www.uff.br/WebQuest/downloads/Suprarrenal.htm> <<

MADEO, A.; MAGGIOLINI, M. Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17 β -estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res*, v. 70, p. 6036–6046, 2010.

MAHMOUD, A.M.; YANG, W.; BOSLAND, M.C. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 140, p. 116–132, 2014.

MALESEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v.72, n.10, p. 921–939, 2007.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARTINS, M.I.M. A reposição de estrogênio diminui o dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e melhora a função cardíaca em ratas. 2003. TESE – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 2003.

MELINA, V.; CRAIG, W.; LEVIN, S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, v. 116, n. 12, p. 1970–1980, 2016.

MENDES, C. Atualidades sobre Saúde, Nutrição e Ecologia Saúde & Ciência, 2015. Acesso em: 21/02/2017. Disponível em>> <http://celiomendes-saude.blogspot.com.br/2015/08/osteoporose-uma-doenca-inflamatoria.html><<

MIRAGHAJANI M.S. et al. Soy Milk Consumption, Inflammation, Coagulation, and Oxidative Stress Among Type 2 Diabetic Patients With Nephropathy. *Diabetes Care*, v. 35, p. 1981–1985, 2012.

MIURA E.M.Y. et al. Avaliação biológica da soja com baixas atividades de inibidores de tripsina e ausência do inibidor Kunitz. *Arch Latinoam Nutr*, v. 51, p. 195–198, 2001.

MORALES-CANÉ, I.; VALVERDE-LEÓN, M.D.R.; RODRÍGUEZ-BORREGO, M.A. Epinephrine in cardiac arrest: systematic review and meta-analysis. *Rev Lat Am Enfermagem*, v. 24, p. 2821, 2016.

MOREIRA, M.R. et al. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptor are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. *Life Sciences*, v. 81, p. 317-326, 2007.

MORENO, I. Sistema Nervoso Simpático. 2016. Disponível em:>><http://knoow.net/ciencterravida/biologia/sistema-nervoso-simpatico/><<

MOURA E.G. et al. Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats - the role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res*, v. 40, n. 1, p. 1-7, 2008.

MOURA E.G.; PASSOS M.C.F. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep*, v. 25, p. 251-269, 2005.

MOURÃO JÚNIOR, C.A.; ABRAMOV, D.M. *Fisiologia Essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MULLEN, E. et al. Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in HepG2 cells. *J Nutr*, v. 134, n. 11, p. 2942-7, 2004.

NAGATA, C. et al. Associations among maternal soy intake, isoflavone levels in urine and blood samples, and maternal and umbilical hormone concentrations (Japan). *Cancer Causes Control*, v. 17, p. 1107–1113, 2006.

NAUDI, A. et al. Cellular Dysfunction in Diabetes as Maladaptive Response to Mitochondrial Oxidative Stress. *Experimental Diabetes Research*, v. 2012, p. 1-14, 2011.

NIELSEN, I.L.; WILLIAMSON, G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Cancer Nutr*, v. 57, n. 1, p. 1-10, 2007.

NIKI, E., et al. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, n. 6, p. 1322-1326, 1995.

NILSSON, B.; OLDE, B.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. *Br J Pharmacol*, v. 163, n. 6, p. 1131–1139, 2011.

NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, v. 43, p. 533–549, 2000.

NORIEGA-LÓPEZ, L. et al. Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *J Biol Chem*, v. 282, n. 28, p. 20657-66, 2007.

OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ORBAN, B.O. et al. Direct effects of recurrent hypoglycaemia on adrenal catecholamine release. *Diab Vasc Dis Res*, v. 12, n. 1, p. 2-12, 2015.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PALACIOS-GONZÁLEZ, B. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1841, p. 132–140, 2014.

PARK, H.J. et al. Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 20, p. 140–148, 2009.

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

POIAN, A.T.; CARVALHO-ALVES, P.C.C. Hormônios e metabolismo: Integração e correções clínicas. São Paulo: Editora Athene. 2005.

PONTI, G. et al. Early postnatal genistein administration permanently affects nitroergic and vasopressinergic systems in a sex-specific way. *Neuroscience*, v. 25, n. 346, p. 203-215, 2017.

QIAN, Y. et al. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF- κ B activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochemistry International*, v. 60, n. 8, p. 759–767, 2012.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*. 1993.

REVANKAR, C.M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, v. 307, n. 5715, p. 1625-30, 2005.

RIMBACH, G. et al., Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1670, n. 3, p. 229–237, 2004.

ROSENFELD, C.S. Homage to the 'H' in developmental origins of health and disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v. 8, n. 1, p. 8-29, 2017.

RUHLEN, R.L. et al. Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the "fetal estrogenization syndrome" and obesity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect*, v. 116, n. 3, p. 322-8, 2008.

RUSCICA, M. et al. Effect of soy on metabolic syndrome and cardiovascular risk factors: a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, p. 1-13, 2016.

RUTHERFURD, S.M. et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. *J. Nutr*, v. 145, p. 372–379, 2015.

SANTANA, M.B. et al. Association between soy and green tea (*Camellia sinensis*) diminishes hypercholesterolemia and increases total plasma antioxidant potential in dyslipidemic subjects. *Nutrition*, v. 24, p. 562–568, 2008.

SCHRADER, C. et al., Genistein as a potential inducer of the anti-atherogenic enzyme paraoxonase-1: studies in cultured hepatocytes *in vitro* and in rat liver *in vivo*. *J Cell Mol Med*, v. 16, n. 10, 2012.

SETCHELL, K.D. et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*, v. 131, p.1362S-1375S, 2001.

SETCHELL, K.D.R. et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, v. 77, p. 411-419, 2003.

SHI, Y. et al. β 2-Adrenergic receptor ablation modulates hepatic lipid accumulation and glucose tolerance in aging mice. *Exp Gerontol*, v. 78, p. 32-8, 2016.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, n. 6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, L.S. Hormônios da glândula adrenal - Bioquímica do tecido animal. Rio Grande do Sul, 2005.

SIMMEN, F.A. et al. Soy protein diet *alters* expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 2, p. 1106–1113, 2010.

SOARES, L.L.; LUCAS, A.M.; BOAVENTURA, G.T. Can organic and transgenic soy be used as a substitute for animal protein by rats? *Braz J Med Biol Res*, v. 38, p. 583–586, 2005.

SOLTYSIK, K.; CZEKAJ, P. Membrane estrogen receptors—is it an alternative way of estrogen action? *J Physiol Pharmacol*, v. 64, p. 129–142, 2013.

SUCHETA, S. et al. Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *J Food Sci Technol*, v. 51, n. 3, p. 551–557, 2014.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA - UNICAMP, 2011.

- TAYLOR, C.K. et al. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutr. Rev.*, v. 67, p. 398–415, 2009.
- TEEKACHUNHATEAN, S. et al. Influence of fructooligosaccharide on pharmacokinetics of isoflavones in postmenopausal women. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2012, p. 783-802, 2012.
- TEKIN, I. et al. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *Journal of Neural Transmission*, v. 121, n. 12, p. 1451–1481, 2014.
- TORRES, N.; TORRE-VILLALVAZO, I.; TOVAR, A.R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 17, n. 6, p. 365-373, 2006.
- TOUSEN, Y. et al. Effects of genistein, an isoflavone, on pregnancy outcome and organ weights of pregnant and lactating rats and development of their suckling pups. *J Nutr Sci Vitaminol*, v. 52, n. 3, p.174-82, 2006.
- TOYOHIRA, Y. et al. Stimulatory effects of the soy phytoestrogen genistein on noradrenaline transporter and serotonin transporter activity. *Mol Nutr Food Res.*, v. 54, n. 4, p. 516–524, 2010.
- TROINA, A.A. et al. Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the off spring body composition, lipid profile and sexual function. *Food Chem Toxicol*, v. 48, p. 697–703, 2010.
- TSE, G.; ESLICK, G.D. Soy and isoflavone consumption and risk of gastrointestinal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr.*, v. 55, n. 1, p. 63-73, 2016.
- VEGA-LOPEZ, S. et al. Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones *Am J Clin Nutr*, v. 81, n. 1, p. 43-9, 2005.
- VELASQUEZ, M.T.; BHATHENA, S.J. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci.*, v. 26, n. 4(2), p. 72-82, 2007.
- VERBERNE, A.J. et al. Adrenaline: insights into its metabolic roles in hypoglycaemia and diabetes. *Br J Pharmacol*, v. 173, n. 9, p. 1425-37, 2016.
- VIEIRA, A.M. Efeitos do consumo de soja e proteína isolada de soja por ratas wistar na lactação sobre o estado nutricional, hormonal e metabólico da progênie adulta. 2016. Dissertação - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- VIEIRA, A.M. et al. Maternal soybean diet during lactation alters breast milk composition and programs the lipid profile in adult male rat offspring. *Endocrine*, v. 60, p. 272-281, 2018.

VINSON, J.A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem*, v. 49, p. 5315-5321, 2001.

VITALE, D.C. et al. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. v. 38, n. 1, p. 15–25, 2013.

WAKADE, A.R. Facilitation of secretion of catecholamines from rat and guinea-pig adrenal glands in potassium-free medium or after ouabain. *J Physiol*, v. 313, p. 481-98, 1981.

WANG, S. et al. Anti-obesity molecular mechanism of soy isoflavones: weaving the way to new therapeutic routes. *Food Funct*, v. 8, p. 3831-3846, 2017.

WANG, J.; JENKINS, S.; LAMARTINIERE, C.A. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary glands following combinational exposure to bisphenol A and genistein. *BMC Cancer*, v. 29, n. 14, p.379, 2014.

WEGGEMANS, R.M.; TRAUTWEIN, E.A. Relation between soy associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: A meta-analysis. *Eur J Clin Nutr*, v. 57, p. 940–946, 2003.

WESTFALL, T.C; WESTFALL, D.P. Adrenergic agonists and antagonists. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (eds) Goodman, Gilman the pharmacological basis of therapeutics. *McGraw-Hill*, v. 11, p. 237–295, 2005.

WIDLANSKY, M.E. et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 42, p. 1149-1160, 2003.

WON, S.B.; HAN, A.; KWONA, Y.H. Maternal consumption of low-isoflavone soy protein isolate alters hepatic gene expression and liver development in rat offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 42, p. 51–61, 2017.

XIAO, R.P. et al. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol. Sci*, v. 27, p. 330–337, 2006.

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*. 2017.

YAN, Z. et al. Association between consumption of soy and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of observational studies. *Eur J Prev Cardiol*, v.1, 2017.

YANAGIHARA. N.; TOYOHIRA, Y.; SHINOHARA, Y. Insights into the pharmacological potential of estrogens and phytoestrogens on catecholamine signaling. *Ann NY Acad Sci*, v. 1129, p. 96–104, 2008.

YANG, H. Soy isoflavones modulate adipokines and myokines to regulate lipid metabolism in adipose tissue, skeletal muscle and liver of male Huanjiang mini-pigs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 365, p. 44–51, 2012.

YANG, R.L. et al. Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* v. 43, p. 154, 2008.

YOON, G.; PARQUE, S. Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats. *Nutr Res Pract*, v. 8, n. 6, p. 618–624, 2014.

YOON, M.; WON, S.B.; HYEKWON, Y. Altered lipid metabolism in rat offspring of dams fed a low-protein diet containing soy protein isolate. *Life sciences*, v. 174, p. 1-7, 2017.

YUAN, J.P.; WANG, J.H.; LIU, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health. *Mol Nutr Food Res*, v. 51, p. 765-781, 2007.