

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EFEITO DE UM IOGURTE DE SOJA SUPLEMENTADO COM ISOFLAVONAS E COM
PROPRIEDADES PROBIÓTICAS SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E ADIPOSIDADE EM
RATOS JOVENS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA

Marla Simone Jovenasso Manzoni

SÃO CARLOS

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITO DE UM IOGURTE DE SOJA SUPLEMENTADO COM ISOFLAVONAS E COM
PROPRIEDADES PROBIÓTICAS SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E ADIPOSIDADE EM
RATOS JOVENS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA**

Marla Simone Jovenasso Manzoni

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
da Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

SÃO CARLOS

2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M296ei

Manzoni, Marla Simone Jovenasso.

Efeito de um iogurte de soja suplementado com isoflavonas e com propriedades probióticas sobre o perfil lipídico e adiposidade em ratos jovens alimentados com dieta hipercolesterolêmica / Marla Simone Jovenasso Manzoni. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

78 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Medicina experimental - rato. 2. Iogurte de soja. 3. Isoflavonas. 4. Probióticos. 5. Metabolismo lipídico. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

Orientadora

Profa. Dra. Ana Dâmaso

Dedico este trabalho a memória de meu avô,

João Jovenasso

“Procurando o bem para os nossos semelhantes encontramos o nosso.”

Platão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente.

A Profa. Dra. Ana Dâmaso, amiga e orientadora, pela dedicação e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Elizeu A. Rossi, pelo fornecimento do iogurte de soja, e por toda atenção dispensada.

Aos Professores integrantes da banca examinadora; Dra. Claudia Oller do Nascimento, Dr. Gilberto Moraes, Dra. Thais Borges e Dra. Maria Teresa Pepato, pela importante contribuição para o enriquecimento e conclusão do trabalho realizado.

Aos Profs. Drs. Mônica L. Aguiar e José Renato Coury, e ao doutorando Marcos Felicetti, do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, por disponibilizar o laboratório, equipamentos e treinamento, necessários para a conclusão dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq, a CAPES e a FAPESP, pela concessão de bolsa e auxílios fornecidos.

A Roseli Aparecida Pinto, técnica do Laboratório de Tecnologia de Alimentos-UNESP/Araraquara, pelo carinho e auxílio técnico.

As amigas Profa. Dra. Ana Claudia G. O. Duarte, Danielle Bernardes, Juciléia B. Bezerra, e Neuli M. Tenório, que muito me ajudaram na coleta de dados, mas principalmente se fizeram presentes com sua amizade.

Aos amigos Nádia, Marcela, Fernanda, Fabiana, Cris, João Paulo, Ricardo, Paulão, Jorge, Wagner, Ivone, Zé, Ana, Tati e Camila, pela colaboração para realização deste trabalho e pela amizade.

A todos os docentes e amigos da Pós-Graduação, que compartilharam conhecimentos técnicos e momentos de amizade.

Aos meus pais, Antonio Jovenasso e Cilene A. Baldini Jovenasso, e a minha irmã Mariele, pelo amor que sempre abriga e torna tudo mais simples.

Ao Cleber, pelo amor que compreende, incentiva, e se faz presente em todos os momentos.

RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos de um iogurte de soja produzido com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus jugurti* 416, e posteriormente suplementado com isoflavonas sobre a adiposidade, perfil lipídico e glicemia, em ratos jovens. Ratos Wistar foram randomicamente divididos em grupos: dieta padrão (P), dieta hipercolesterolêmica (H), dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão (HP); dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + iogurte de soja suplementado com isoflavonas (HPII); dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo (HPP), dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo suplementado com isoflavonas (HPPI), dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas (H+II); dieta hipercolesterolêmica + placebo (H+P) e dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas (H+PI). Os grupos P e H receberam dietas padrão e hipercolesterolêmica, respectivamente, por 6 semanas. Os animais dos grupos HP, HPII, HPP e HPPI receberam dieta hipercolesterolêmica por 3 semanas, como tratamento preliminar para o desenvolvimento da hipercolesterolemia, e então passaram a consumir dieta padrão e ou esta associada aos produtos de soja, por adicionais 3 semanas. Os animais dos grupos H+II, H+P e H+PI receberam dieta hipercolesterolêmica associada aos produtos de soja por 6 semanas. Os produtos de soja (iogurte suplementado com isoflavonas, placebo e placebo suplementado com isoflavonas) foram administrados na dose de 1 ml/rato/dia. Os animais receberam água e alimento *ad libitum*. Os efeitos benéficos do iogurte de soja sobre os tecidos adiposos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) parecem ser devido às isoflavonas, uma vez que o diâmetro dos adipócitos (micrometros) nos animais do grupo HPP foi maior (EPI: 105.66 ± 13.36 ; RET: 134.95 ± 25.40) quando comparado ao dos animais dos grupos HPII (EPI: 93.17 ± 12.80 ; RET: 108.62 ± 15.50) e HPPI (EPI: 93.06 ± 15.10 ; RET: 112.34 ± 18.21). Os microrganismos probióticos acentuaram o efeito anti-lipogênico das isoflavonas para o RET (HPII: 108.62 ± 15.50 micrometros versus HPPI: 112.34 ± 18.21 micrometros). Além disso, o iogurte de soja promoveu aumento da glicemia, tornando-a similar a reportada para o grupo P, não apresentando efeito sobre o perfil lipídico. Por outro lado, a administração dos produtos de soja associados à ingestão da dieta hipercolesterolêmica apresentou diferentes efeitos sobre a adiposidade, os quais parecem depender da localização do tecido adiposo. Assim, podem ser os responsáveis pelo aumento do diâmetro (micrometros) dos adipócitos do RET (H+II: 122.31 ± 1.39 ; H+P: 124.48 ± 1.53 ou H+PI: 124.85 ± 1.09 versus P: 99.68 ± 1.49 ou H: 103.26 ± 0.76), ou redução do diâmetro destas células no EPI (H+II: 96.42 ± 0.68 e H+PI: 94.87 ± 0.69) comparado ao grupo P (99.47 ± 0.95). Do mesmo modo, o efeito sobre o EPI parece ser devido às isoflavonas. Os probióticos não influenciaram a biodisponibilidade das isoflavonas, porém aumentaram as concentrações plasmáticas do HDL – colesterol. O iogurte de soja suplementado com isoflavonas não apresentou efeito sobre os triglicerídeos plasmáticos, porém aumentou a glicemia. Se estudos futuros confirmarem os resultados obtidos, o iogurte de soja suplementado com isoflavonas poderá oferecer novas possibilidades para a prevenção da obesidade e anormalidades do metabolismo lipídico.

ABSTRACT

This study investigated the effects of soy yogurt fermented by *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus jugurti* 416 supplemented with isoflavones on adipose tissue, blood lipid, and glucose levels on juvenile rats. Male Wistar rats were then randomly divided into groups: chow diet (C), cholesterol-enriched diet (H), cholesterol-enriched diet/chow diet (HC), cholesterol-enriched diet/chow diet plus soy yogurt supplemented with isoflavones (HCYI), cholesterol-enriched diet/chow diet plus placebo (HCP), cholesterol-enriched diet/chow diet plus placebo supplemented with isoflavones (HCPI), cholesterol-enriched diet plus soy yogurt supplemented with isoflavones (H+YI), cholesterol-enriched diet plus placebo (H+P), and cholesterol-enriched diet plus placebo supplemented with isoflavones (H+PI). C and H groups were fed for 6 weeks on a chow diet or a cholesterol-enriched diet, respectively. Rats in the HC, HCYI, HCP, and HCPI groups were fed a cholesterol-enriched diet for 3 weeks as a preliminary treatment to create hypercholesterolemia. Rats were then given the chow diet or the chow diet plus soy products for additional 3 weeks. Additionally, animals in the H+YI, H+P, and H+PI groups were fed for 6 weeks on a cholesterol-enriched diet plus soy products. The soy products (yogurt supplemented with isoflavones, placebo, and placebo supplemented with isoflavones) were fed to each animal at the rate of 1ml/day. Food and water were consumed ad libitum. The beneficial effects of soy yogurt on epididymal (EPI) and retroperitoneal (RET) fat pads was likely due to isoflavones because adipocyte circumference (micrometers) in the HCP group was significantly larger (EPI: 105.66 ± 13.36 ; RET: 134.95 ± 25.40) than that in the HCYI group (EPI: 93.17 ± 12.80 ; RET: 108.62 ± 15.50) and HCPI group (EPI: 93.06 ± 15.10 ; RET: 112.34 ± 18.21). The probiotic micro-organism accentuated the antilipogenic effect of isoflavones on RET (HCYI: 108.62 ± 15.50 micrometers versus HCPI: 112.34 ± 18.21 micrometers). Moreover, the soy yogurt increased glucose concentration similar to that in the chow group but did not change blood lipids. On the other hand, soy supplementations with cholesterol-enriched diet exhibited regional variations in fat pads. It may be responsible for the increased observed on retroperitoneal adipocyte circumference (micrometers) (H+YI: 122.31 ± 1.39 ; H+P: 124.48 ± 1.53 , or H+PI: 124.85 ± 1.09 versus C: 99.68 ± 1.49 or H: 103.26 ± 0.76) or decreased of epididymal adipocyte circumference (micrometers) (H+YI: 96.42 ± 0.68 , and H+PI: 94.87 ± 0.69) compared with the C group (99.47 ± 0.95). In the same way, effect on epididymal adipose tissue was likely due to isoflavones. Probiotics do not seem to enhance the effect of isoflavones, but improved HDL cholesterol plasma levels. Soy yogurt supplemented with isoflavones did not promote changes on plasma triacylglycerol, but increased glucose concentration. If these results are confirmed in further studies, they will offer new approaches to obesity prevention or lipid metabolism abnormalities.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química das principais isoflavonas da soja (forma ativa)	9
FIGURA 2 - Colonização microbiana do trato gastrointestinal humano	21
FIGURA 3 - Principais fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal	23
FIGURA 4 - Possíveis mecanismos de ação dos probióticos sobre o metabolismo lipídico	26
FIGURA 5 - Peso relativo dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas	40
FIGURA 6 - Diâmetro dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas	42
FIGURA 7 - Peso relativo dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas	46
FIGURA 8 - Diâmetro dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas	47
FIGURA 9 - Concentrações plasmáticas de colesterol-total e HDL – colesterol em ratos alimentados com diferentes dietas	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ganho de peso corporal, ingestão alimentar, eficiência alimentar, peso relativo do fígado e músculo gastrocnêmio, em ratos alimentados com diferentes dietas	43
TABELA 2 - Perfil lipídico e glicemia em ratos alimentados com diferentes dietas ..	45
TABELA 3 - Ganho de peso corporal, ingestão alimentar, eficiência alimentar, peso relativo do fígado e músculo gastrocnêmio em ratos alimentados com diferentes dietas	48
TABELA 4 – Glicemia e concentrações plasmáticas de triglicerídeos em ratos alimentados com diferentes dietas	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. Alimentos Funcionais.....	4
<i>3.1.1. Soja</i>	<i>5</i>
<i>3.1.1.1. Isoflavonas</i>	<i>8</i>
<i>3.1.1.1.1. Absorção e metabolismo das isoflavonas.....</i>	<i>11</i>
<i>3.1.1.1.2. Lipoproteínas e isoflavonas</i>	<i>11</i>
<i>3.1.1.1.3. Adiposidade e isoflavonas</i>	<i>16</i>
3.2. Probióticos	20
<i>3.2.1. Trato Gastrointestinal</i>	<i>20</i>
<i>3.2.2. Microbiota Intestinal</i>	<i>20</i>
<i>3.3.3. Microrganismos Probióticos</i>	<i>23</i>
<i>3.3.3.1. Ação dos probióticos na redução do colesterol</i>	<i>25</i>
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Animais e Condições Experimentais	28
4.2. Protocolo Experimental	28
<i>4.2.1. Parte A (Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para</i>	

<i>Dieta Padrão Associada aos Produtos de Soja</i>	28
<i>4.2.1.1. Grupo dieta padrão (P)</i>	28
<i>4.2.1.2. Grupo dieta hipercolesterolêmica (H)</i>	29
<i>4.2.1.3. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão (HP)</i>	29
<i>4.2.1.4. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + iogurte de soja suplementado com isoflavonas (HPH)</i>	29
<i>4.2.1.5. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo (HPP)</i>	29
<i>4.2.1.6. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo suplementado com isoflavonas (HPPI)</i>	29
<i>4.2.2. Parte B (Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de Soja)</i>	30
<i>4.2.2.1. Grupo dieta padrão (P)</i>	30
<i>4.2.2.2. Grupo dieta hipercolesterolêmica (H)</i>	30
<i>4.2.2.3. Grupo dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas (H+H)</i>	30
<i>4.2.2.4. Grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo (H+P)</i>	30
<i>4.2.2.5. Grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas (H+PI)</i>	30
<i>4.3. Obtenção dos Produtos de Soja</i>	31
<i>4.3.1. Preparo e Manutenção das Culturas Láticas</i>	31
<i>4.3.2. Preparo do Iogurte de Soja Suplementado com Isoflavonas e com Propriedades Probióticas</i>	31
<i>4.3.3. Contagem de Células Viáveis</i>	33
<i>4.3.4. Preparo dos Placebos</i>	33
<i>4.4. Administração do Iogurte e dos Placebos</i>	33
<i>4.5. Dietas</i>	34

4.5.1. <i>Dieta Padrão</i>	34
4.5.2. <i>Dieta Hipercolesterolêmica</i>	34
4.6. Consumo Alimentar	35
4.7. Ganho de Peso Corporal	35
4.8. Eficiência Alimentar (EA)	35
4.9. Experimento e Coleta das Amostras	35
4.10. Análises Bioquímicas no Plasma	36
4.10.1. <i>Colesterol Total</i>	36
4.10.2. <i>HDL – colesterol</i>	37
4.10.3. <i>Triglicerídeos</i>	37
4.10.4. <i>Glicose</i>	38
4.11. Determinação do Diâmetro dos Adipócitos	38
4.12. Análise Estatística dos Dados	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Parte A (Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão Associada aos Produtos de Soja)	40
5.1.1. <i>Peso Relativo dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal ...</i>	40
5.1.2. <i>Diâmetro dos Adipócitos dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal</i>	41
5.1.3. <i>Ganho de Peso Corporal, Ingestão e Eficiência Alimentar, Peso Relativo do Fígado e Músculo Gastrocnêmio</i>	43
5.1.4. <i>Análises Bioquímicas no Plasma</i>	44
5.2. Parte B (Efeitos da Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de	45

Soja)	
<i>5.2.1. Peso Relativo dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal ...</i>	45
<i>5.2.2. Diâmetro dos Adipócitos dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal</i>	46
<i>5.2.3. Ganho de Peso Corporal, Ingestão Alimentar, Eficiência Alimentar, Peso Relativo do Fígado e Músculo Gastrocnêmio</i>	47
<i>5.2.4. Análises Bioquímicas no Plasma</i>	49
<i>5.2.4.1. Concentrações plasmáticas de colesterol – total e HDL–colesterol</i>	49
<i>5.2.4.2. Glicemia e concentração plasmática de triglicerídeos</i>	50
6. DISCUSSÃO	52
6.1. Parte A (Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão Associada aos Produtos de Soja)	52
6.1. Parte B (Efeitos da Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de Soja)	59
7. CONCLUSÃO	65
7.1. Dieta Hipercolesterolêmica	65
7.2. Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar (Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão)	65
7.3. Parte A (Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão Associada aos Produtos de Soja)	66
7.4. Parte B (Efeitos da Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de Soja)	66
7.5. Considerações Finais	66

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade na infância e adolescência tem alcançado proporções epidêmicas em alguns países, estando associada ao aparecimento de doenças como o Diabetes tipo II, a hipertensão, as dislipidemias, doenças do fígado e complicações cardiovasculares, de maneira que estratégias de prevenção e controle devem ser iniciadas em todas as idades (KIESS et al., 2006; DEHGHAN et al., 2005; SABIN et al., 2004).

Neste contexto, evidências sugerem que o consumo ou a suplementação de alimentos com fitoestrógenos, tais como as isoflavonas encontradas na soja e produtos derivados, podem apresentar efeito benéfico sobre a obesidade e glicemia, o que caracterizaria estes alimentos como funcionais (LIHONG et al., 2005; LEPHART et al., 2004; BATHENA & VELASQUEZ, 2002; SETCHELL, 1998).

A este respeito, as isoflavonas, as quais apresentam estrutura química semelhante a do estrogênio humano, parecem atuar benéficamente sobre o tecido adiposo, uma vez que os adipócitos são células estrogênio responsivas em humanos e animais (KIM et al., 2006; ALI et al., 2004; DIEUDONNE et al., 2004; NAZZ et al., 2003; UMLAND et al., 2000). Além disso, estudos têm reportado a atuação benéfica deste fitoestrógeno sobre as concentrações plasmáticas do colesterol (LUKACZER et al., 2006; KAWAKAMI et al., 2005), sendo a hipercolesterolemia o principal fator de risco associado ao desenvolvimento de doenças arterio-cardiovasculares (ABD EL-GAWAD et al., 2005) e o colesterol apontado como um importante fator na regulação do metabolismo lipídico nos tecidos adiposos brancos (ISLAM et al., 2005).

Dentre os fatores que influenciam a absorção dos fitoestrógenos, estão a dieta e a microbiota intestinal (ROWLAND et al., 2003). Assim, a administração de probióticos, definidos como suplemento alimentar contendo bactérias vivas, que beneficiam o hospedeiro

pela melhora da sua microbiota intestinal, tem demonstrado ser efetiva em aumentar a biodisponibilidade das isoflavonas (BOWEY et al., 2003; FULLER, 1989).

Além disso, o efeito dos microrganismos probióticos na redução do colesterol tem sido amplamente investigado, embora ainda não exista consenso sobre seu efeito hipocolesterolemizante (GILL & GUARNER, 2004).

O exposto justifica o estudo dos possíveis efeitos de um iogurte de soja suplementado com isoflavonas e com propriedades probióticas sobre o perfil lipídico e adiposidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Verificar os efeitos de um iogurte de soja produzido com *Enterococcus faecium* CRL 183 (microrganismo probiótico) e *Lactobacillus jugurti* 416, e posteriormente suplementado com isoflavonas sobre a adiposidade, perfil lipídico e glicemia, em ratos jovens alimentados com diferentes padrões de dieta.

2.2. Específicos

- Comparar e definir as alterações específicas sobre a adiposidade, perfil lipídico e glicemia dependente do tipo de dieta (padrão ou hipercolesterolêmica) em ratos jovens;

- Verificar os efeitos da mudança do padrão alimentar (dieta hipercolesterolêmica para dieta padrão) sobre a adiposidade, perfil lipídico e glicemia, em ratos jovens;

- Verificar os efeitos do iogurte de soja suplementado com isoflavonas e com propriedades probióticas, associado à mudança do padrão alimentar (dieta hipercolesterolêmica para dieta padrão) ou à ingestão de dieta hipercolesterolêmica, sobre a adiposidade, perfil lipídico e glicemia em ratos jovens;

- Comparar os efeitos dos produtos de soja (iogurte de soja suplementado com isoflavonas, placebo e placebo suplementado com isoflavonas) associados à mudança do padrão alimentar (dieta hipercolesterolêmica para dieta padrão) ou à ingestão de dieta hipercolesterolêmica, sobre a adiposidade, perfil lipídico e glicemia, em ratos jovens.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Alimentos Funcionais

Alimentos de origem vegetal e animal contêm, em adição aos macro e micronutrientes essenciais, outros compostos biologicamente ativos, que se incorporados à dieta como parte integral de um alimento ou como um suplemento alimentar, podem conferir significativo benefício à saúde, além da nutrição básica. Deste conceito tem resultado o desenvolvimento de uma classe especial de alimentos, designado como alimentos funcionais (SETCHELL, 1998).

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou uma portaria (MS nº. 398, de 30/04/99), definindo os alimentos funcionais, como sendo “alimentos consumidos como parte da dieta usual, que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos e/ou capacidade de reduzir o risco de doenças crônico-degenerativas, além das suas funções nutricionais básicas. Tais propriedades devem ser comprovadas junto às autoridades competentes, quando do registro do alimento ou do novo rótulo” (RODRIGUES, 1999). Dentre os alimentos citados como funcionais encontram-se a aveia, a soja, o tomate, a linhaça, os vegetais crucíferos (repolho, brócolis, couve-flor), o alho, o suco de uva e o vinho tinto, o chá verde, as frutas cítricas, os peixes de água fria, por conterem os ácidos graxos polinsaturados ômega 3, os prebióticos e probióticos (HASLER, 1998).

Em 1995, ANDERSON et al. realizaram uma meta-análise de 38 estudos clínicos reportados em 29 artigos, correlacionando o consumo de soja e as concentrações de lipídios séricos em humanos. Esses autores concluíram que a proteína de soja diminuiu as concentrações séricas do colesterol total (9,3%), LDL-colesterol (12,9%), e triglicerídeos (10,5%) sem afetar as concentrações do HDL-colesterol. Isto levou a agência reguladora de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration (FDA)*, a reconhecer e aprovar a alegação “25g de proteína de soja, como parte de uma dieta baixa em

gordura saturada e colesterol, pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares”. De maneira semelhante, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou: “O consumo diário de no mínimo 25g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Outras evidências científicas sobre propriedades terapêuticas dos alimentos foram aprovadas pela ANVISA (2005), envolvendo compostos funcionais. Entre estes estão as fibras alimentares, tais como a beta glucana, presentes na aveia, os ácidos graxos da família ômega 3 e o licopeno, presente no tomate.

3.1.1. Soja

Evidências históricas e geográficas indicam que a soja (*Glycine max*), foi domesticada no século XI a.C. na China, somente chegando ao Ocidente no final do século XV e início do século XVI, trazida pelos navios europeus. No entanto, permaneceu como curiosidade botânica durante os séculos que se seguiram, passando a ter importância econômica no século XIX, data provável de sua chegada ao Brasil, mais precisamente no ano de 1882, na Bahia (MIURA et al., 2000; BONETTI, 1981).

Atualmente, é o alimento que oferece maiores possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais no Brasil. Além de abundante (o Brasil é o segundo produtor mundial), é rica em proteínas e vitaminas (Quadro 1) e, seu valor funcional tem sido evidenciado, à medida que atua no controle e prevenção de doenças (BIANCO, 2000).

Embora a redução do colesterol pela ação da proteína de soja tenha sido evidenciada em vários estudos, o mecanismo pelo qual esse efeito é alcançado ainda não é totalmente esclarecido (SONG, et al., 2003). Vários compostos associados à proteína de soja têm sido implicados na redução do colesterol, entre estes estão: inibidores de tripsina, ácido fítico, saponinas, isoflavonas, fibras e aminoácidos (ERDMAN 2000).

QUADRO 1 - Composição do grão de soja cru por 100g.

COMPONENTE	
Macronutrientes (g)	
Proteínas	38,0
Lipídeos	19,0
Carboidratos	23,0
Minerais (mg)	
Cálcio	240
Fósforo	580
Ferro	9,4
Sódio	1,0
Potássio	1900
Magnésio	220
Minerais (ug)	
Zinco	3200
Cobre	980
Vitaminas (u)	
A	12
Vitaminas (mg)	
E	1,8
B1	0,83
B2	0,30
Niacina	2,2
Fibra Alimentar* (g)	
Solúveis	1,8
Não solúveis	15,3
Totais	17,1
Energia (Kcal)	
	417

Adaptado de Kawaga, 1995.

* A fibra alimentar é constituída pelo teor das fibras propriamente ditas e pelo teor de carboidratos insolúveis.

Postula-se que um dos fatores responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico da soja, possa ser a relação entre os aminoácidos lisina/arginina. Quanto a isto, estudos têm demonstrado que o aumento da oferta de lisina através da administração da proteína de soja à animais promoveu diminuição no valor da relação insulina/glucagon, comparados aos valores reportados para animais alimentados com caseína. O inverso (aumento na proporção insulina/glucagon) possui relação direta com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resultante dos efeitos hiperlipidêmico e aterogênico promovidos nesta relação (TORRES et al., 2006).

Por outro lado, o ácido fítico presente na soja, também pode estar relacionado às propriedades hipocolesterolêmicas por possuir propriedade quelante em relação a determinados minerais, como o zinco, diminuindo a sua absorção no trato-gastrointestinal (ERDMAN, 2000), o que proporcionaria maior absorção do cobre, contribuindo para a ação hipocolesterolêmica (ROSSI, 2001; MITAL & STEINKRAUS, 1975).

A soja também contém fatores antinutricionais. Entre estes estão os inibidores de tripsina, responsáveis pela diminuição do aproveitamento das proteínas de maneira geral. Dessa forma, para aumentar o valor nutricional da soja e seus produtos, há a necessidade de processamentos térmicos para inativá-los. Estudos recentes consideram, entretanto, a possibilidade de que os inibidores de tripsina sejam capazes de aumentar a secreção de colescistoquinina, que estimula a vesícula biliar aumentando a síntese de ácidos biliares e, portanto proporcionando aumento no consumo do colesterol circulante (MIURA et al, 2000). Neste contexto, há ainda a hipótese de que as saponinas encontradas na soja possam contribuir para a diminuição do colesterol pelo aumento da produção de ácidos biliares (SHOREY et al., 1985).

Além destes fatores hipocolesterolêmicos, em 1992, LOVATI et al. postularam a hipótese de que as frações protéicas da soja 11S e 7S (globulinas) podem estimular os receptores de alta atividade do LDL-c. Quanto a isto, estudos com culturas de células demonstraram que a globulina 7S da soja e peptídeos derivados promoveram aumento da expressão dos receptores de LDL-c (LOVATI et al., 2000; MANZONI et al., 2003).

As fibras presentes na soja também foram apontadas como responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico. No entanto, ERDMAN (2000) concluiu que a maioria dos produtos de soja utilizados nas pesquisas contém pouca ou nenhuma fibra, não parecendo ser o principal fator de atuação sobre o colesterol.

Recentemente, TORRES et al. (2006) concluíram que os peptídeos presentes na soja podem mediar muitas das ações da proteína da soja, sobre as concentrações plasmáticas e hepáticas de colesterol e triglicerídeos, auxiliando no controle e prevenção de doenças mediadas pelas alterações do metabolismo lipídico. A compilação dos estudos permite a proposição de um mecanismo de ação no qual a proteína da soja reduz o valor da proporção insulina/glucagon, o que promoveria a redução da expressão do fator de transcrição SREBP (*sterol regulatory element-binding proteins*) na isoforma-1, com conseqüente redução da expressão de várias enzimas envolvidas na lipogênese, captação e transporte do colesterol, assim como enzimas responsáveis pela produção dos ácidos biliares. Em adição, o fígado foi apontado como o órgão principal para o efeito da proteína de soja sobre o metabolismo do colesterol. No entanto, devido à complexa interação entre a soja e suas isoflavonas, o mecanismo pelo qual a proteína de soja exerce seus efeitos benéficos sobre o metabolismo lipídico ainda não pode ser totalmente entendido, uma vez que as isoflavonas parecem estar envolvidas na redução das concentrações dos lipídeos séricos.

3.1.1.1. Isoflavonas

As isoflavonas são compostos químicos naturalmente presentes na soja (fitoquímicos). Compreendem as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína (Figura 1), os respectivos β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina) e os conjugados malonil-glicosídeos (6'' -O-malonildaizina, 6'' -O-malonilgenistina, 6'' -O-malonilglicitina) e acetil-glicosídeos (6'' -O-acetildaizina, 6'' -O-acetilgenistina e 6'' -O-acetilglicitina) (KUDOU et al., 1991; WANG & MURPHY, 1994).

A concentração de isoflavonas no grão de soja é geneticamente controlada e influenciada pelas condições ambientais (CARRÃO-PANIZI et al., 1998). Em produtos de soja e derivados, é influenciada pelas condições de processamento (GÓES-FAVONI et al.,

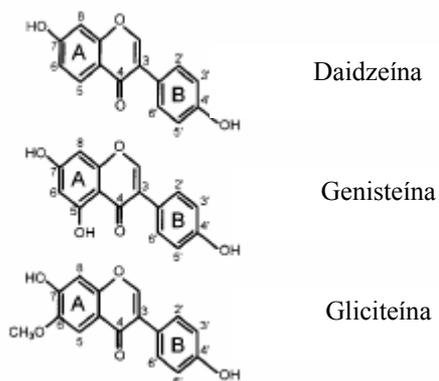


FIGURA 1 - Estrutura química das principais isoflavonas da soja (forma ativa).

Adaptado de Messina, 1999.

2004). Alimentos como o tofu, miso e tempeh, apresentam concentrações de isoflavonas de 33,7mg, 29,4mg e 62,5mg/ 100g, respectivamente (WANG & MURPHY, 1996).

Durante as últimas décadas, evidências científicas vêm demonstrando que as isoflavonas podem trazer benefícios no controle de doenças crônicas tais como câncer, diabetes, osteoporose e doenças cardiovasculares, além de aliviar os sintomas da menopausa. Os mecanismos pelos quais as isoflavonas podem exercer estes efeitos parecem estar relacionados às suas propriedades agonistas-antagonistas dos estrógenos, inibição da atividade enzimática e efeito antioxidante (MESSINA, 1999; ESTEVES & MONTEIRO, 2001).

Por apresentarem estrutura química similar a do hormônio humano estrogênio, as isoflavonas são denominadas de fitoestrógenos (SETCHELL, 1998). Essa similaridade estrutural proporciona a habilidade destes compostos em se ligar aos receptores de estrogênio em várias células humanas, atuando como agonista, sob circunstâncias em que a produção do hormônio é drasticamente diminuída, como na menopausa, por exemplo, e como antagonista, em circunstâncias em que as concentrações circulantes estão normais (McCARTY, 2006). No entanto, o efeito estrogênico das isoflavonas é muito mais fraco (KURZER, 2003). Em base molecular a potência das isoflavonas corresponde a 1/1000 a 1/100.000 da atividade biológica do estradiol (MARKIEWICZ et al, 1993; MAYR et al., 1992). A literatura científica cita dois

tipos de receptores de estrogênio; os receptores α e os receptores β , cuja expressão se dá em vários tecidos, incluindo o tecido adiposo (PERDERSEN et al., 2001; CRANDALL et al., 1998). Têm se relatado que as isoflavonas possuem afinidade por ambos, porém, a afinidade parece maior para o receptor β . De acordo com KUIPER et al. (1998), a afinidade de ligação da genisteína para com o receptor β foi vinte vezes maior do que para a observada para o receptor α .

As isoflavonas podem também exercer efeitos que não estão relacionados à atividade estrogênica e sim à inibição da atividade de enzimas envolvidas no controle do crescimento e regulação celular, as quais proporcionariam o crescimento de células cancerígenas. Assim, têm se reportado que as isoflavonas inibem a atividade de enzimas como tirosina proteína quinase, MAP quinase, DNA topoisomerase I e II, e a ribossoma S6 quinase, (AKIYAMA et al., 1987; THORNBURN & THORNBURN, 1994; OKURA et al., 1988; MARKOVITS, 1989; LINASSIER et al., 1990). As isoflavonas podem também aumentar a concentração do fator β de crescimento tumoral (TGF β), que atua na inibição do crescimento de células cancerígenas (PETERSON et al, 1998; BENSON et al., 1996).

Adicionalmente, as isoflavonas são conhecidas por sua atividade antioxidante (MIQUEL et al., 2006). As propriedades antioxidantes podem ser responsáveis pelo efeito anti-carcinogênico ou pela inibição do processo trombótico e o efeito bloqueador da proliferação de células musculares lisas nas paredes das artérias (RUIZ-LARREA et al., 1997; POTTER et al., 1996). A genisteína apresenta função antioxidante, impedindo a oxidação do LDL-colesterol e a sua conseqüente deposição nas artérias, para a formação das placas de ateroma (JENKINS et al., 2000).

3.1.1.1.1. Absorção e metabolismo das isoflavonas

Os três tipos de isoflavonas presentes na soja (daidzina, genistina e glicitina) estão na forma de glicosídeos conjugados. Nesta forma não são absorvidas pelo organismo humano. Somente as isoflavonas livres da molécula de açúcar ou seus produtos metabólitos, são absorvidos pela barreira epitelial do intestino. Assim, uma vez ingeridas, as isoflavonas são hidrolisadas no intestino por beta-glicosidases produzidas por bactérias, sendo então convertidas em seus derivados ativos, denominados de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína). As agliconas, as formas ativas no corpo, são então absorvidas ou submetidas a uma fermentação adicional com a formação de metabólitos específicos. A daidzeína é metabolizada a equol ou O-demetilangolesina e a genisteína a p-etilfenol. Após a absorção no trato intestinal estas moléculas são incorporadas nos quilomícrons, que as transportam ao sistema linfático antes de alcançar o sistema circulatório. Os quilomícrons distribuem as isoflavonas para os tecidos extra-hepáticos. As isoflavonas também são enviadas para o fígado, sendo excretadas através da bile (fezes), ou reabsorvidas pela circulação entero-hepática. De maneira similar ao estrogênio endógeno, são eliminadas pelos rins, de modo que a urina constitui a principal via de excreção (BATHENA & VELASQUEZ, 2002; ANDERSON & GARNER, 1997).

3.1.1.1.2. Lipoproteínas e isoflavonas

Para circularem no sangue, um ambiente aquoso, os lipídeos não polares (triglicerídeos e ésteres do colesterol) associam-se a lipídeos anfipáticos (fosfolipídeos e colesterol) e proteínas. A ligação lípides-proteínas dá origem a complexos moleculares de grande importância metabólica: as lipoproteínas (Lp). A fração protéica das lipoproteínas é conhecida como apolipoproteína (apo) ou apoproteína (MAYES, 1994).

As Lp podem ser separadas segundo as suas densidades relativas, por ultracentrifugação, sendo classificadas em: quilomícrons (QM); lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL); lipoproteínas de densidade intermediária (IDL); lipoproteínas de baixa densidade (LDL); lipoproteína (a) [Lp (a)]; e lipoproteínas de alta densidade (HDL), que são subdivididas em HDL2 e HDL3 (HIRATA & HIRATA, 2002).

No intestino, os lipídeos provenientes da dieta são incorporados a apo B-48, sintetizada nos enterócitos, formando os quilomícrons (QM), lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TG), as quais migram para os vasos linfáticos, atingindo a circulação sanguínea na altura do ducto torácico. Sofrem então, a ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL), presente no endotélio dos capilares, de maneira que os TG são hidrolisados à ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos liberados unem-se a albumina e são utilizados pelos tecidos periféricos ou reesterificados e armazenados sob a forma de TG, principalmente nos adipócitos. Nesse processo dinâmico, em que o teor de TG dos QM é gradativamente reduzido pela ação da LPL, e o teor de colesterol esterificado aumenta, proveniente da HDL, assim como ocorre a transferência de apolipoproteínas, principalmente a apo E, formam-se os remanescentes de quilomicrons (RQM). Estes possuem afinidade pelos receptores de LDL hepáticos. Com a interiorização dos RQM, a via de transporte exógeno de ácidos graxos se completa (TULENKO & SUMNER, 2002; GARCIA & OLIVEIRA, 1992).

Secretadas pelos hepatócitos, as VLDL, alcançam a circulação sanguínea e da mesma forma que os QM, sofrem remoção de TG, pela atuação da LPL, transformando-se em remanescentes de VLDL, as IDL. Parte das IDL é removida da circulação por interação com receptores de LDL hepáticos e a outra parte permanece por mais tempo na circulação e sofre a ação da lipase hepática (LH) originando as LDL (BROWN & GOLDSTEIN, 1986), as quais fazem parte da via metabólica das lipoproteínas ricas em colesterol, sendo responsável pela distribuição do colesterol para os tecidos hepáticos e periféricos (SCHAEFER, 2002).

As HDL são sintetizadas e secretadas pelo fígado e intestino e a apo A-I é essencial para sua formação. Exercem papel fundamental no transporte reverso do colesterol, transportando-o dos tecidos periféricos para o fígado, para serem reutilizados ou excretados como ácidos biliares (MACKINNON et al., 1987; MILLER et al, 1985). As HDL retêm o colesterol livre, presente nas membranas celulares dos tecidos periféricos, convertendo-o a CE pela atuação da enzima lecitina-colesterol acil transferase (LCAT), sendo então incorporado ao núcleo da partícula de HDL (TULENKO & SUMNER, 2002). As HDL são removidas da circulação sistêmica, por três processos: o CE é transferido para outras classes de LP (RQM, VLDL e IDL) por ação da proteína de transferência de CE (CETP), e então transportado ao fígado; as HDL podem ser captadas por endocitose mediada por receptores SR-B1 (*scavenger receptor B1*), com provável envolvimento de outros receptores. E finalmente, os CE das HDL podem ser captados pelo fígado ou tecidos extra-hepáticos sem a captação das partículas de HDL. Esta última hipótese não é totalmente esclarecida, no entanto, os receptores SR-B1 parecem estar envolvidos (JI et al., 1997; FIDGE, 1999).

As Lp (a) são sintetizadas predominantemente no fígado, sendo heterogêneas em tamanho e densidade, com características físicas e de composição semelhantes à LDL, e têm sido associadas à manifestação de doenças coronarianas (SCHAEFER, 2002; GARCIA & OLIVEIRA, 1992).

As anormalidades do metabolismo lipídico ocorrem nos locais de produção ou utilização das lipoproteínas, causando várias hipo ou hiperlipoproteinemias, as quais são designadas dislipidemias. Se resultarem de ações medicamentosas ou forem consequência de alguma doença de base (hipotireoidismo, diabetes, síndrome nefrótica) são consideradas dislipidemias secundárias. Todas as outras formas são tidas como dislipidemias primárias. Podem também ser designadas por tipos, segundo algumas características fenotípicas (GIANINNI, 1998; QUINTÃO, 1992):

- Tipo I: a característica fundamental é a presença de QM no sangue, após jejum de 12 a 14 horas, em razão da hipoatividade da LPL, o que determina portanto, hipertrigliceridemia exógena. O soro ou plasma tem aspecto cremoso e a dosagem bioquímica revela TG com valores superiores a 1500mg/dl;
- Tipo II: caracteriza-se pela hipercolesterolemia, podendo ser catalogada como IIa (aumento exclusivo da colesterolemia - > 240 mg/dl) ou IIb (elevação simultânea do colesterol e dos TG, ambos com valores entre 250 e 500 mg/dl);
- Tipo III: elevações simultâneas e semelhantes de CT e TG (relação 1:1), habitualmente superiores a 300 mg/dl. Representa expressão genética modificada da apo E, que se exprime por incapacidade de metabolização das IDL;
- Tipo IV: Caracteriza-se por hipertrigliceridemia isolada, habitualmente com valores de TG > 300 mg/dl. Pode resultar da maior síntese de VLDL, acompanhada ou não pela incapacidade para sua metabolização. Pode ser poligênica, com participação de fatores genéticos e ambientais, ou de caráter familiar, com defeito ainda não suficientemente conhecido.
- Tipo V: aumento de TG acima de 1500 mg/dl. Há sempre deficiência da atividade da LPL e aumento da síntese de VLDL.

Neste contexto, o risco para cardiopatia isquêmica é função exponencial dos níveis de colesterol plasmático (MARTINEZ, 1992).

SETCHELL (1985) foi o primeiro pesquisador a sugerir que as isoflavonas presentes na soja poderiam contribuir para redução das concentrações plasmáticas de colesterol, uma vez que estes compostos apresentam uma atividade estrogênica fraca. Evidências para esta hipótese foram posteriormente apresentadas por ANTONY et al. (1998). Estes autores compilaram alguns resultados de estudos realizados com animais, os quais atribuíram a redução das concentrações plasmáticas de CT às isoflavonas presentes na dieta.

Resultados do mesmo grupo também confirmaram a ação das isoflavonas sobre a redução do LDL e VLDL colesterol em animais. Adicionalmente, animais fêmeas tiveram a fração HDL significativamente aumentada.

O efeito das isoflavonas sobre as concentrações de colesterol sanguíneo parece depender da forma em que são ingeridas. Ou seja, na sua forma isolada (em cápsulas, por exemplo), enriquecendo alimentos ou em combinação com a proteína de soja. A esse respeito LICHTENSTEIN (2001), embasado nos resultados de vários estudos concluiu que a ingestão da proteína de soja destituída de isoflavonas ou mesmo a ingestão das isoflavonas na sua forma isolada parece não apresentar efeito benéfico sobre o LDL e HDL-colesterol. Por outro lado, o consumo da proteína de soja com isoflavonas ou alimentos enriquecidos com isoflavonas promoveu redução modesta do LDL-colesterol. As discrepâncias nos resultados foram atribuídas hipoteticamente à quantidade e qualidade das isoflavonas ingeridas, à eficiência de absorção, e a fatores a serem determinados.

Um estudo conduzido por SANDERS et al. (2002) concluiu que as isoflavonas presentes na proteína de soja proporcionaram aumento do HDL-colesterol em homens saudáveis, mas nenhum efeito foi evidenciado sobre as concentrações do LDL-colesterol. Contrariamente, SONG et al. (2003) concluíram que as isoflavonas foram efetivas em reduzir o LDL-colesterol em hamsters, comparados a animais que receberam caseína. MORTENSEN et al. (2004) reportaram que o consumo de um suplemento de soja rico em isoflavonas apresentou efeito protetor à aterosclerose, possivelmente pela redução do colesterol plasmático, mesmo quando os animais eram deficientes em receptores para o LDL-colesterol. As isoflavonas também foram efetivas em diminuir as concentrações de triglicérides plasmáticos, e a relação LDL/HDL em mulheres na menopausa que receberam uma suplementação com proteína de soja contendo fitoestrógenos por um período de três meses (TEEDE et al., 2005). Porém, observou-se aumento da Lp (a) plasmática. Esta lipoproteína é

tida como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Em ambos, homens e mulheres têm sido associada com o aparecimento prematuro de doenças cardiovasculares, embora os mecanismos ainda não tenham sido elucidados (STEIN & ROSENSON, 1997). Contrariamente, um estudo conduzido por KREIJKAMP-KASPERS et al., (2005) reportaram que a ingestão das isoflavonas reduziu a Lp (a) circulante, embora nenhum efeito benéfico tenha sido observado sobre as concentrações plasmáticas de lipídeos, glicose e insulina.

Alguns mecanismos têm sido apontados como responsáveis pela ação hipocolesterolêmica das isoflavonas da soja, podendo-se destacar a estimulação da excreção de ácidos biliares, pelo aumento da atividade da 7α -hidroxilase, enzima chave na conversão do colesterol a ácidos biliares, controlando a principal via de excreção do colesterol (KAWAKAMI et al., 2005; KAWAKAMI et al., 2004; MEZEI et al., 2002; NI et al, 1999) e efeitos hormonais, com efeito benéfico sobre as concentrações plasmáticas do colesterol atribuído à função estrogênio-símile das isoflavonas. No entanto, não existem resultados conclusivos (McCARTY, 2006).

As pesquisas não são conclusivas quanto ao papel das isoflavonas sobre o efeito hipocolesterolêmico da soja (TORRES et al., 2006; DEMONTY et al., 2003). Adicionalmente, FITZPATRICK (2003) apontou que os resultados podem ser influenciados pelo tipo de produto derivado da soja, o tempo de duração do estudo e as diferentes dietas.

3.1.1.1.3. Adiposidade e isoflavonas

O tecido adiposo pode ser descrito como uma associação de células que armazena gordura, as células adiposas ou adipócitos. Outros tipos de células encontradas neste tecido são fibroblastos, macrófagos, pré-adipócitos, células endoteliais e células do músculo liso, as quais não atuam especificamente nas funções típicas do tecido adiposo em si,

mas são necessárias para a integridade, suporte e nutrição tecidual (GIMENO & KLAMAN, 2005; GARCIA et al., 2002).

Nos mamíferos existem dois tipos de tecido adiposo: o branco e o marrom. Ambos são capazes de estocar energia na forma de triglicerídeos e hidrolisá-los em ácidos graxos e glicerol. No entanto, enquanto o tecido adiposo branco fornece lipídeos como substrato para o organismo, o tecido adiposo marrom, utiliza os ácidos graxos para a produção de calor, devido à ação da proteína desacopladora mitocondrial (UCP1) presente neste tecido (CINTI, 2005).

As células uniloculares do tecido adiposo branco contêm uma única e grande gota lipídica, que empurra seu núcleo alongado contra a membrana plasmática, possuindo poucas mitocôndrias e pequeno espaço citoplasmático. Essas são esféricas quando isoladas, poliédricas ou ovais quando agrupadas. Os adipócitos que formam o tecido adiposo marrom são menores, possuem numerosas gotas lipídicas e mitocôndrias, e o núcleo celular está localizado no centro da célula (PÉNICAUD et al., 2000).

A massa do tecido adiposo depende do diâmetro e do número de adipócitos. O diâmetro dos adipócitos é determinado pelos processos de lipogênese e lipólise, e embora ocorra uma variação dos diâmetros em função dos locais anatômicos e do sexo, há um diâmetro crítico, a partir do qual novas células de gordura são formadas. A lipogênese envolve a incorporação dos ácidos graxos livres (AGL) nos adipócitos, armazenando-os na forma de TG, com muitas enzimas regulando este processo. Uma vez que o principal determinante da lipogênese no tecido adiposo é a reesterificação dos AGL, a Lipase Lipoprotéica (LPL) possui importância superior. A hidrólise dos TG estocados nos adipócitos à AGL e glicerol ocorre pelo processo de lipólise, sendo a enzima Lipase Hormônio Sensível (LSH) o fator limitante (DI GIROLAMO et al., 1998; PRINS & O'RAHILLY, 1997; LANGIN et al., 1996).

Quando o balanço de energia é positivo, ou seja, quando a ingestão de energia advinda dos alimentos é maior do que o gasto energético, o excesso de energia é estocado na forma de gordura, no tecido adiposo (KONTUREK et al., 2005). E de acordo com HAUSMAN et al. (2001), não somente fatores parácrinos, mas também fatores de circulação, e influências neurais possuem papel importante sobre os processos de lipogênese e lipólise no tecido adiposo. Neste contexto, o próprio tecido adiposo expressa numerosos fatores que podem ser implicados na modulação da adipogênese, entre estes estão a leptina e a resistina (GIMENO & KLAMAN, 2005).

Acreditava-se que o número dos adipócitos poderia aumentar consideravelmente somente durante a infância e adolescência, de maneira que o excesso de energia em crianças promoveria a obesidade hiperplásica. Enquanto que para os adultos, o excesso de energia promoveria a hipertrofia (aumento do tamanho) das células. Contudo, estudos recentes têm demonstrado que novos adipócitos podem se formar a partir de pré-adipócitos como os fibroblastos, em qualquer período da vida e que o desenvolvimento da obesidade em adultos é acompanhado pelo aumento tanto do número quanto do tamanho das células adiposas (KONTUREK et al., 2005).

O tecido adiposo branco possui função de armazenamento de energia, atua como isolante térmico e proteção de órgãos internos, assim como apresenta-se bem descrita atualmente a sua função secretora. Inúmeras substâncias protéicas e não protéicas têm sido identificadas no tecido adiposo, sendo secretadas por pré-adipócitos, adipócitos ou ambas as células. Estas moléculas bioativas são denominadas adipocitocinas, as quais estão ativamente envolvidas no metabolismo energético, sendo algumas consideradas como substâncias endócrinas que, inclusive, podem interagir com o sistema nervoso central. (DÂMASO et al., 2005; GIMENO & KLAMAN, 2005). As adipocitocinas produzidas pelo tecido adiposo podem exercer diferentes funções: leptina e resistina, relacionadas à função metabólica; TNF-

α e Interleucina-6, relacionados ao sistema imune; corticosteróides e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), relacionados à função endócrina; e inibidor de plasminogênio-1 (PAI-1) e peptídeo natriurético atrial, relacionados ao sistema cardiovascular (KLAUS, 2004).

Assim, o tecido adiposo secreta uma grande variedade de proteínas amplamente ativas, que regulam o metabolismo tão bem quanto o processo inflamatório, contribuindo para as complicações de saúde associadas à obesidade (JUGE-AUBRY et al., 2005).

Os efeitos da soja e seus componentes sobre o tecido adiposo têm sido estudados. Quanto a isto BATHENA & VELASQUEZ (2002), verificaram que a substituição da proteína animal pela proteína vegetal da soja potencializou a perda de peso em humanos obesos submetidos a dietas com restrição calórica. Entretanto, o que permanece em questão é se os efeitos benéficos da soja sobre a obesidade são devido às proteínas da soja ou às isoflavonas presentes em sua composição. Estudo recente demonstrou que a suplementação com isoflavonas da soja foi efetiva em proporcionar redução da massa corporal e risco do desenvolvimento de obesidade em mulheres na menopausa (MORI et al., 2004). Em ratas ovariectomizadas a combinação de isoflavonas e exercício também foi efetiva em prevenir a acumulação de gordura corporal, e promover o aumento da massa magra (WU et al., 2004). Em ratos machos observou-se que as isoflavonas promoveram redução do tecido adiposo visceral epididimal (ALI et al., 2004).

As isoflavonas parecem afetar os mecanismos centrais do controle de apetite, e em animais reduzem o tamanho das células adiposas pela diminuição da expressão da enzima lipogênica LPL, verificando-se ainda aumento da lipólise e diminuição da captação de glicose nestas células em estudos *in vitro* (YAMORI, 2004; NAZZ et al, 2003; HARMON & HARP, 2001; SZKUDELSKA et al., 2000).

3.2. Probióticos

3.2.1 Trato Gastrointestinal

O trato gastrointestinal humano pode ser dividido em quatro regiões anatômicas: o esôfago, o estômago, o intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), e o intestino grosso ou cólon (DUNNE et al., 2001).

O intestino é um ecossistema complexo, composto por três componentes que estão permanentemente em contato e interação; as células do hospedeiro, os nutrientes e a microbiota. As funções intestinais incluem o conhecido processo que leva à digestão dos alimentos, à absorção dos nutrientes, e a uma série de atividades que objetivam a defesa contra agressores externos. Esta última e importante função do intestino é baseada em três constituintes essenciais: a microbiota, a barreira constituída pela mucosa intestinal e o sistema imune local (BOURLIOUX et al., 2003).

3.2.2. Microbiota Intestinal

A importância das bactérias que compõem o trato gastrointestinal foi negligenciada por muito tempo. Somente no início do século XX é que Metchnikoff hipotetizou a importância dos *Lactobacillus* para a saúde humana e longevidade, pela ingestão de bactérias por meio de iogurte e produtos fermentados. Atualmente, o papel da microbiota gastrointestinal na manutenção da saúde de homens e animais é fato consolidado pela literatura científica (HOLZAPFEL et al., 1998). Porém, a alta complexidade deste ecossistema dificulta o entendimento de seu funcionamento e interações (BERG, 1996).

A colonização do estômago, intestino delgado e intestino grosso é variável, assim como as condições fisiológicas destes ambientes também o são. Após a passagem pela cavidade oral, onde o pH é próximo do básico, o baixo pH do estômago (2,5 – 3,0) é destrutivo para a maioria dos microrganismos. Assim, poucas colônias são encontradas no

estômago. Devido aos fluídos intestinais agressivos (sais biliares e sucos pancreáticos, por exemplo), o intestino delgado também compreende um ambiente hostil para o crescimento das células bacterianas. A quantidade de bactérias é muito baixa no duodeno, aumentando gradativamente até o íleo terminal. É no cólon, portanto, que as bactérias encontram condições favoráveis (pH, teor de oxigênio e trânsito intestinal lento) para o seu desenvolvimento, alcançando proporções significativas (HOLZAPFEL et al., 1998; BOURLIOUX et al., 2003). O intestino de um humano adulto contém cem trilhões de células bacterianas, o que corresponde a dez vezes o total de células eucarióticas do corpo humano (GILL & GUARNER, 2004). A Figura 2 apresenta a colonização microbiana do trato gastrointestinal humano.

A microbiota é constituída por microrganismos vivos, que em parceria com outros componentes efetuam importantes funções fisiológicas no hospedeiro (BOURLIOUX et al., 2003). Estes efeitos podem ser locais ou sistêmicos, benéficos ou prejudiciais. A este respeito, enzimas produzidas pelos microrganismos podem atuar metabolicamente no intestino na conversão de substâncias em compostos que podem ser benéficos ou nocivos ao hospedeiro. Estes compostos podem afetar a nutrição, a fisiologia, a eficácia de drogas, a

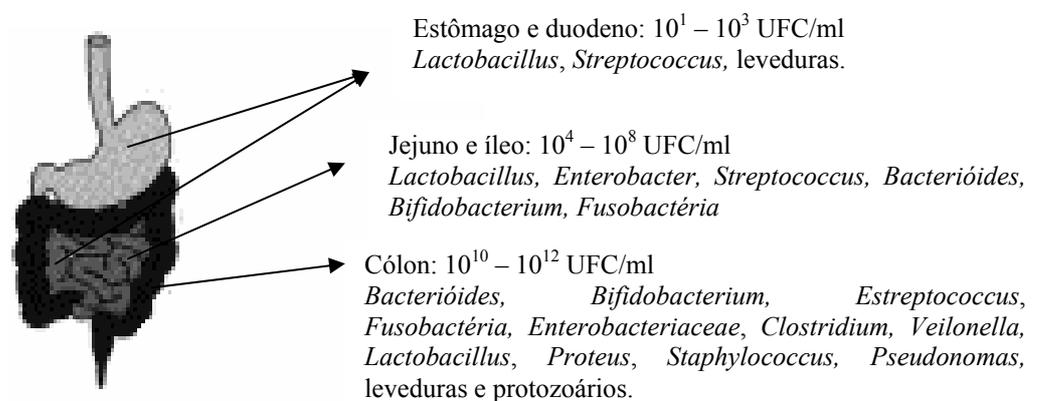


FIGURA 2 - Colonização microbiana do trato gastrointestinal humano.

Adaptado de Simon & Gorbach, 1982.

carcinogênese e o processo de envelhecimento, assim como a resistência do hospedeiro a infecção. A microbiota intestinal também atua na decomposição de certos nutrientes, produzem vitamina B, estimulam o sistema imune e produzem enzimas digestivas e protetoras (MITSUOKA, 1992).

Estima-se que o colón de adultos saudáveis apresente cerca de quatrocentas a quinhentas espécies de bactérias. Porém, pesquisadores afirmam que nem todas as espécies foram identificadas, e que os novos métodos baseados no reconhecimento do DNA poderão auxiliar neste processo (RASTALL, 2004; DUNNE, et al., 2001; LUCKEY, 1972).

No cólon, as bactérias encontram os restos de alimentos não digeridos e absorvidos pelo hospedeiro. Se o substrato é um carboidrato (principalmente fibras e açúcares não digeríveis), o produto da fermentação deste pelas bactérias origina os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), predominantemente; acetato, propionato e butirato. Estes ácidos são responsáveis por efeitos fisiológicos no hospedeiro, uma vez que são absorvidos no intestino grosso, passando para a veia portal. Em particular atuam sobre o metabolismo dos microrganismos que compõem a microbiota intestinal, regulação hepática de lipídeos e açúcares, e fornecimento de energia aos colonócitos. Adicionalmente aos efeitos gerais, propriedades benéficas específicas têm sido identificadas para os principais AGCC. Portanto, o equilíbrio da microbiota intestinal é um importante fator na manutenção da saúde do hospedeiro (BOURLIOUX et al., 2003; NAIDU et al., 1999; CUMMINGS, 1997; TOPPING, 1996). Os principais fatores que influenciam a composição da microbiota estão apresentados na Figura 3.

Existe interesse crescente nas possibilidades de manipulação da composição da microbiota intestinal através da ingestão de alimentos ou ingredientes alimentares. O objetivo principal é aumentar o número ou a atividade dos microrganismos promotores de saúde (HOLZAPFEL et al., 1998). Deste conceito surgiram os probióticos.

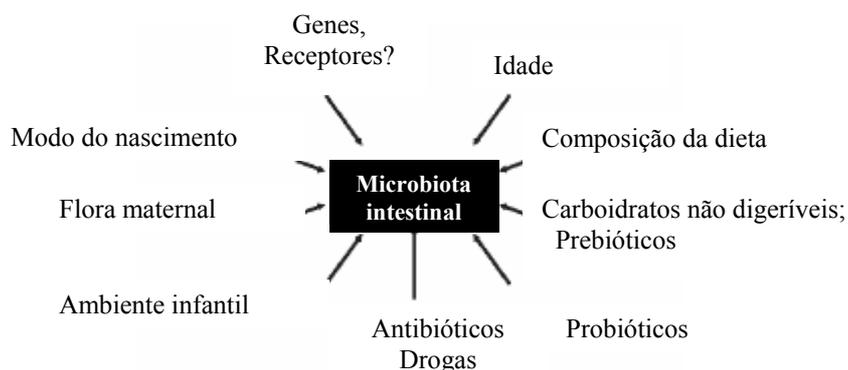


FIGURA 3 - Principais fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal.

Fonte: Adaptado de Bourlioux et al., 2003.

3.3.3. *Microrganismos Probióticos*

Os probióticos têm sido definidos como bactérias vivas que quando ingeridas podem melhorar a microbiota do hospedeiro e assim, promover a saúde (FULLER, 1989). Diferentes tipos de produtos ou suplementos contendo microrganismos com propriedades probióticas estão disponíveis comercialmente na forma liofilizada ou como alimentos fermentados (HOLZAPFEL, 1998).

No entanto, para consumo na forma de alimentos, os probióticos foram recentemente definidos como alimentos contendo microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidade suficiente, exercem efeitos benéficos à saúde além da nutrição básica, devendo conter microrganismos em quantidade suficiente até o seu prazo de validade final. As espécies mais comumente utilizadas e estudadas são as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, e *Saccharomyces*, particularmente *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, e *S. cerevisiae boulardii* (BOURLIOUX et al., 2003).

Para ser considerado probiótico, o microrganismo deve atender a critérios básicos, tais como (SANTOS et al., 2003; DUNNE, et al., 2001):

- Biossegurança;
- Origem humana;
- Resistência ao processamento tecnológico;
- Resistência ao suco gástrico;
- Resistência à bile;
- Adesão aos tecidos intestinais;
- Sobrevivência no trato gastrointestinal;
- Produção de substâncias bactericidas;
- Estimulação do sistema imune;
- Habilidade para influenciar respostas metabólicas (assimilação de colesterol, atividade da lactase e produção de vitaminas);
- O alimento deverá conter número elevado de microrganismo probiótico; dosagem mínima de 10^6 UFC/ml.

Numerosos efeitos benéficos têm sido sugeridos como resultado da atividade dos probióticos no intestino. Estes microrganismos têm demonstrado efetividade no alívio dos sintomas provocados pela intolerância à lactose e redução na incidência de diarreia, especialmente aquela causada por rotavírus. Evidências para outras alegações de saúde, tais como redução do colesterol, controle de câncer e estimulação do sistema imune exigem estudos adicionais. A comparação entre as pesquisas tem sido dificultada pela falta de controle na condução das experimentações, as quais têm utilizado número pequeno de amostras, curto período de duração, e a falta de definição quanto à dose e a concentração de microrganismos (GILL & GARNER, 2004; TESHIMA, 2003; SCHEINBACH, 1998).

Os mecanismos pelos quais os probióticos podem melhorar a saúde incluem (MISHRA & LAMBERT, 1996):

- Produção de ácidos, peróxidos ou agentes bactericidas que atuam contra microrganismos patogênicos;
- Competição com os patógenos pelos receptores da mucosa intestinal, impedindo assim a adesão destes;
- Competição com os patógenos por substratos;
- Estimulação do sistema imune.

3.3.3.1. Ação dos probióticos na redução do colesterol

Em 1963 foi publicado o primeiro trabalho que relacionou a ingestão de bactérias e redução do colesterol em humanos. Os autores reportaram que o consumo elevado de leites fermentados por espécies de lactobacilos reduziu o colesterol sérico em indivíduos da tribo Samburu (SHARPER et al., 1963). Vários estudos que tratam do efeito da redução do colesterol por microrganismos probióticos vêm sendo realizados, porém os resultados são controversos, evidenciando a atuação destes microrganismos ou não (SIMONS et al., 2006; ABD EL-GAWAD; 2005; JAHREIS et al., 2002; ASHAR & PRAJAPATI, 2000).

O mecanismo pelo qual os probióticos afetam as concentrações de colesterol não é completamente entendido. Contudo, algumas hipóteses têm sido propostas. A Figura 4 resume estes mecanismos de ação. De acordo com esta Figura, uma primeira hipótese sugere a assimilação do colesterol de origem exógena pelas células bacterianas. No entanto, uma segunda hipótese considera que a ingestão diária dos microrganismos probióticos poderia aumentar a produção da enzima sais biliares hidrolase (BSH), promovendo aumento da desconjugação dos ácidos biliares. Neste caso, a capacidade de influenciar a concentração de colesterol é hipotetizada através de dois mecanismos; no primeiro, os ácidos biliares

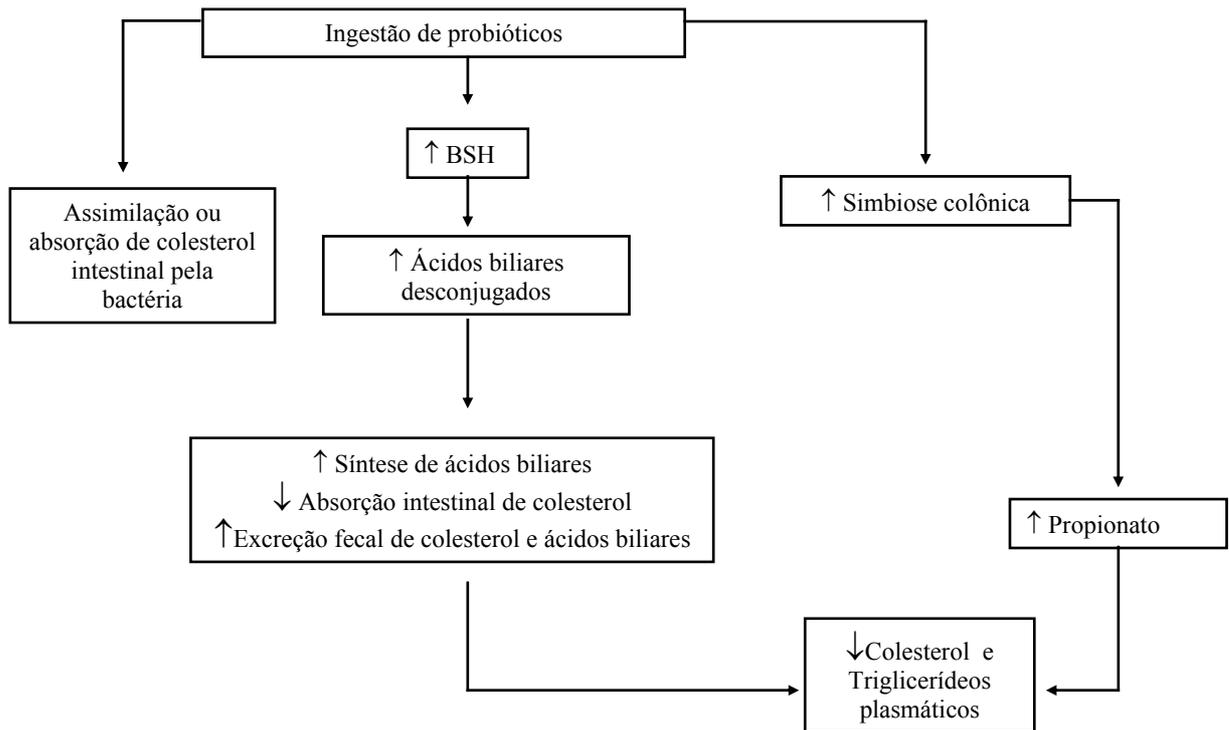


FIGURA 4 - Possíveis mecanismos de ação dos probióticos sobre o metabolismo lipídico. Adaptado de Santos et al., 2003.

desconjugados absorveriam menor quantidade de lipídeos do trato gastrointestinal, quando comparados aos ácidos conjugados, e poderiam ainda induzir uma precipitação do colesterol intestinal, promovendo redução na sua absorção no intestino, o que conseqüentemente influenciaria as concentrações plasmáticas. O segundo mecanismo envolve a circulação êntero-hepática. A maior parte dos ácidos biliares é reabsorvida na porção do íleo terminal, entretanto, se estes forem desconjugados e dehidroxilados por bactérias intestinais que convertem os ácidos biliares primários (cólico e quenodesoxicólico) em ácidos biliares secundários (desoxicólico e litocólico), esse reaproveitamento será reduzido, levando assim, ao aumento da excreção desses ácidos. Uma vez que o colesterol é utilizado na produção dos ácidos biliares, o aumento da excreção e catabolismo destes ácidos, conseqüentemente promoveria a redução na concentração de colesterol plasmático, à medida que é solicitado para a formação de novos ácidos biliares. A terceira hipótese atribui a redução das concentrações de colesterol à inibição da síntese de colesterol hepático e/ou aumento da

redistribuição do colesterol do plasma para o fígado, através da ação dos AGCC, representado na figura pelo propionato. Adicionalmente, uma dose mínima do consumo de probióticos, que seja efetiva na diminuição dos níveis de colesterol sérico ainda não é conhecida (SANTOS et al., 2003; LOVEGROVE & JACKSON, 2003; CHIKAI et al., 1987).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e Condições Experimentais

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos da Linhagem Wistar, logo após o desmame (21 dias de idade), procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos.

Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício, do Departamento de Educação Física e Motricidade Humana da Universidade Federal de São Carlos, em gaiolas individuais de polipropileno opaco (30 x 20 x 13 cm) com grades de aço-inoxidável, em temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo artificial (claro/escuro) de 12/12 horas, recebendo água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos foram efetuados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995).

4.2. Protocolo Experimental

4.2.1. Parte A (Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão Associada aos Produtos de Soja)

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

4.2.1.1. Grupo dieta padrão (P)

Animais que receberem dieta padrão (comercial) por um período de 6 semanas (n = 7).

4.2.1.2. Grupo dieta hipercolesterolêmica (H)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica por um período de 6 semanas (n = 7).

4.2.1.3. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão (HP)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica por um período de 3 semanas e então passaram a receber dieta padrão por adicionais 3 semanas (n = 5).

4.2.1.4. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + iogurte de soja suplementado com isoflavonas (HPII)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica por um período de 3 semanas e então passaram a receber dieta padrão e iogurte de soja suplementado com isoflavonas por adicionais 3 semanas (n = 5).

4.2.1.5. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo (HPP)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica por um período de 3 semanas e então passaram a receber dieta padrão e placebo por adicionais 3 semanas (n = 5).

4.2.1.6. Grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo suplementado com isoflavonas (HPPI)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica por um período de 3 semanas e então passaram a receber dieta padrão e placebo suplementado com isoflavonas por adicionais 3 semanas (n = 5).

4.2.2. Parte B (Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de Soja)

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

4.2.2.1. Grupo dieta padrão (P)

Animais que receberam dieta padrão (comercial) por um período de 6 semanas (n = 7).

4.2.2.2. Grupo dieta hipercolesterolêmica (H)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica por um período de 6 semanas (n = 7).

4.2.2.3. Grupo dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas (H+II)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica associada ao iogurte de soja suplementado com isoflavonas por um período de 6 semanas (n = 7).

4.2.2.4. Grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo (H+P)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica associada ao placebo por um período de 6 semanas (n = 5).

4.2.2.5. Grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas (H+PI)

Animais que receberam dieta hipercolesterolêmica associada ao placebo suplementado com isoflavonas por um período de 6 semanas (n = 5).

4.3. Obtenção dos Produtos de Soja

O iogurte de soja foi processado na Unidade de Produção e Desenvolvimento de Derivados da Soja – UNISOJA (UNESP – Campus de Araraquara), a cada 7 dias de acordo com a metodologia padronizada por ROSSI (2000), como descrito nos itens 4.3.1. e 4.3.2.

4.3.1. Preparo e Manutenção das Culturas Lácticas

Foram utilizadas culturas puras de *Enterococcus faecium* CRL 183 e de *Lactobacillus jugurti* 416 procedentes da coleção de culturas do Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA) da Argentina e do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) de Campinas, respectivamente.

Estas culturas lácticas foram mantidas congeladas (-18°C) em um meio composto de leite em pó desnatado, reconstituído a 10% e suplementado com 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 5% de glicerol como protetor crioscópico. Os inóculos foram preparados pela transferência de 10% das culturas de manutenção, reativada em leite em pó desnatado, reconstituído a 10% e esterilizado em autoclave (121°C/15 minutos). Em seguida foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 14 a 16 horas.

As culturas de *E. faecium* CRL 183 e *L. jugurti* 416 foram misturadas apenas no momento da inoculação na proporção de 1:1 e foram freqüentemente submetidas a exames bacterioscópicos para verificação da pureza.

4.3.2. Preparo do Iogurte de Soja Suplementado com Isoflavonas e com Propriedades Probióticas

Foram pesados 52g de soro de leite em pó e 35g de extrato aquoso de soja em pó. O volume desejado foi completado com água destilada. A estes ingredientes foram adicionados óleo de soja (0,8%), lactose (1,0%) e emulsificante Recodan® (0,14%). A

mistura obtida foi homogeneizada através de um agitador mecânico na velocidade máxima, durante 5 minutos. Após a homogeneização, esta mistura foi submetida a um aquecimento controlado até atingir 50°C, quando então foi adicionada a sacarose (6%) e, posteriormente, a 70°C, foi acrescentado o leite em pó (2,5%) com a finalidade de conferir o grau de doçura desejado e aumentar o teor de sólidos totais, respectivamente. Prosseguindo o aquecimento, na temperatura de 80°C, a gelatina (0,3%) foi adicionada, com a finalidade de melhorar a consistência do produto.

Em seguida, a temperatura foi elevada a 95°C e mantida por 5 minutos para que a pasteurização do meio fosse realizada. Este foi então resfriado em banho de água e gelo até atingir a temperatura de 37°C e em seguida, efetuou-se a inoculação em condições assépticas e sob agitação lenta, de maneira a incorporar o mínimo possível de ar. O inóculo foi constituído por 1,5% (v/v) de *E. faecium* e 1,5% (v/v) de *L. jugurti*. A fermentação foi conduzida em temperatura de 37°C, por tempo suficiente para ser atingido o pH de aproximadamente 4,5.

Finalmente, o produto já fermentado foi gradualmente resfriado, evitando o choque térmico, sendo primeiramente colocado em água até que a temperatura do produto atingisse 30°C e, posteriormente, em banho de água e gelo, para então ser transferido à temperatura de refrigeração ($\pm 5^\circ\text{C}$).

Uma vez que as isoflavonas da soja foram perdidas durante o processo de fabricação do produto (ROSSI et al., 2000), o iogurte de soja com propriedades probióticas foi suplementado com uma mistura de isoflavonas (Isoflavin®, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil), em uma concentração de 50mg de isoflavonas/100 ml de iogurte de soja. As isoflavonas encontradas no Isoflavin® são as daidzina, genistina e glicitina e seus derivados ativos (daidzeína, genisteína e gliciteína).

4.3.3. Contagem de Células Viáveis

De acordo com GONZALES et al. (1990) um produto para ser considerado probiótico deve conter no mínimo 10^6 UFC/ml do microrganismo probiótico inoculado. Assim, o iogurte de soja suplementado com isoflavonas e com propriedades probióticas foi avaliado quanto ao número de células viáveis em sua constituição final, através do crescimento dos microrganismos em meios específicos. A contagem de *E. faecium* foi realizada em meio M17-ágar (Difco[®]) e a contagem de *L. jugurti* em meio MRS-ágar (Difco[®]), ambas pela técnica “pour plate”. As colônias foram contadas e tiveram suas características morfológicas observadas por meio de exame bacterioscópico das lâminas coradas pela técnica de Gram (ROSSI, 2000).

4.3.4. Preparo dos Placebos

O placebo de composição idêntica ao iogurte, mas sem conter os microrganismos em estudo foi acidificado pela adição direta de ácido láctico até que fosse alcançado pH idêntico ao do iogurte. O placebo suplementado recebeu a adição de isoflavonas como anteriormente citado para o iogurte de soja no item 4.3.2. O produto permaneceu sob refrigeração ($\pm 10^\circ\text{C}$) durante todo o período de utilização (ROSSI, 2000).

4.4. Administração do Iogurte e dos Placebos

Os produtos de soja (iogurte suplementado com isoflavonas, placebo e placebo suplementado com isoflavonas) foram administrados na dose de 1 ml/rato/dia, por meio de seringa, de forma espontânea, diretamente na boca de cada animal.

4.5. Dietas

4.5.1. Dieta Padrão

A dieta padrão foi constituída por uma ração comercial para ratos, na forma de peletes (Primor[®] MP-77), contendo (por 100 g de ração): 23 g de proteína, 49 g de carboidrato, 4 g de gordura total, 5 g de fibras, 7 g de cinzas, 6 g de vitaminas e 6g de água, fornecendo um total de 3,78 Kcal/g. Estabeleceu-se uma oferta média de 40g/dia.

4.5.2. Dieta Hipercolesterolêmica

A dieta hipercolesterolêmica foi preparada de acordo com ROSSI (2000), a partir da adição de colesterol e ácido cólico à ração comercial para ratos (Primor[®] MP-77), como descrita a seguir.

Em um lote de ração incorporou-se 1% (p/p) de colesterol (Sigma[®] C8503) e 0,25% (p/p) de ácido cólico (Sigma[®] C1254). Para a incorporação desses produtos à ração, foi utilizado o método de nebulização dos componentes dissolvidos em éter dietílico estabilizado com 10 ppm de Butil Hidroxi Tolueno (Carlo Erba[®]) e em etanol absoluto (Merck[®]), respectivamente.

Cada componente foi aspergido separadamente sobre a ração, em capela, permanecendo por 12 horas para a completa evaporação dos solventes.

Posteriormente, a ração foi acondicionada em sacos plásticos escuros para evitar a passagem de luz, e mantida sob refrigeração durante todo o período de utilização.

Da mesma maneira que para a ração comercial, estabeleceu-se uma oferta média de 40 g/dia.

4.6. Consumo Alimentar

O consumo alimentar de cada animal, foi registrado diariamente durante todo o período experimental, e calculado através da diferença de peso entre a ração ofertada e as sobras.

4.7. Ganho de Peso Corporal

Os valores do peso corporal de cada animal foram registrados diariamente durante todo o período experimental, sendo determinado a partir da diferença entre o peso corporal do dia atual e o do dia anterior.

4.8. Eficiência Alimentar (EA)

Para o cálculo da EA foi utilizada a fórmula:

$$EA = [\text{Ganho de peso corporal diário (g)} / \text{ingestão alimentar diária (g)}] \times 100\%$$

4.9. Experimento e Coleta das Amostras

Os animais dos grupos experimentais foram sacrificados por decapitação em guilhotina, ao final de 6 semanas de tratamento. Os tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET), o músculo gastrocnêmio (GAST) e o fígado (FIG) foram removidos e pesados. Imediatamente após a extração, os tecidos adiposos brancos foram pesados e utilizados para a determinação do diâmetro dos adipócitos. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugado para a determinação da glicemia e perfil lipídico. As amostras foram estocadas em freezer a -20 °C. Para as análises bioquímicas no plasma os animais não foram submetidos a jejum.

4.10. Análises Bioquímicas no Plasma

Foram realizadas as determinações das concentrações plasmáticas do colesterol-total, HDL-colesterol, triglicerídeos e glicose, utilizando-se o método enzimático colorimétrico (CELM[®]) para diagnóstico “in vitro” específico para cada dosagem. Para tal utilizou-se um espectrofotômetro, modelo UV-1601PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

4.10.1. Colesterol Total

Esta metodologia tem como princípio a oxidação do colesterol pela ação da colesterol oxidase (COD), com prévia hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase (COE). O colesterol é oxidado, produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este composto produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF), catalisada pela peroxidase (POD), com a formação de uma quinoneiimina vermelha, com um máximo de absorção em 505 nanômetros. As reações seguem de acordo com o seguinte esquema:

COE



COD



POD



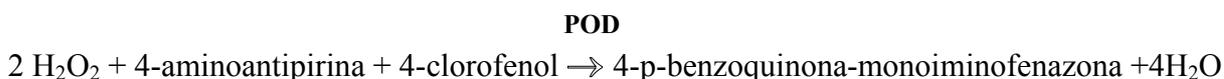
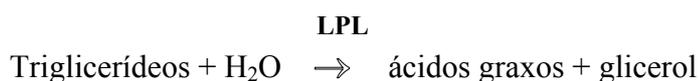
A intensidade da coloração formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra e estável por 120 minutos.

4.10.2. HDL – colesterol

A determinação desta fração é iniciada pela precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente), mediante adição do ácido fosfotúngstico. No sobrenadante, separado por centrifugação, permanecem as lipoproteínas de alta densidade (HDL). A determinação do colesterol ligado a estas lipoproteínas segue as reações descritas no item 4.10.1.

4.10.3. Triglicerídeos

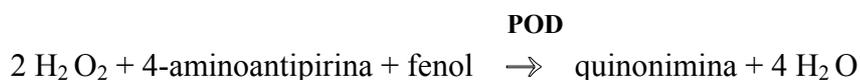
Esta metodologia tem como princípio a hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoprotéica (LPL), produzindo glicerol e ácidos graxos. O glicerol é fosforilado com ATP na presença da glicerol quinase (GK), formando glicerol-3-fosfato, o qual é oxidado liberando peróxido de hidrogênio na presença da enzima glicerol fosfato oxidase (GPO). O H₂O₂, na presença da 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, numa reação catalisada por uma peroxidase (POD), formam a 4-p-benzoquinona-monoiminofenazona, a qual possui um máximo de absorção em 505 nanômetros, segundo o seguinte esquema de reação:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos na amostra e estável por 60 minutos.

4.10.4. Glicose

Esta metodologia tem como princípio o fato de uma glicose-oxidase (GOD) hidrolisar a glicose produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), formando a antipirilquinomina (substância corada), com um máximo de absorção em 505 nm. A cor formada é proporcional à concentração de glicose da amostra, de acordo com a seguinte reação:



4.11. Determinação do Diâmetro dos Adipócitos

Para a determinação do diâmetro dos adipócitos, uma amostra de aproximadamente 100 mg dos tecidos adiposos brancos retroperitoneal e epididimal foi pesada. A seguir, as amostras foram imersas em tampão colidina 0.2M, com pH 7,4, contendo 1% de tetróxido de ósmio. As amostras foram incubadas a 37 °C por um período de 24 h. Em seguida, as células foram lavadas e suspensas em solução salina morna e imediatamente fixadas em lâminas para posterior medida das áreas dos adipócitos. Este método foi previamente descrito por HIRSCH & GALLIAN (1968), e padronizado por DÂMASO (1996). Os adipócitos foram identificados aleatoriamente de modo que somente fossem selecionados aqueles que permaneceram intactos. Para tal utilizou-se um microscópio óptico,

modelo BX60 (Olympus Corp., New York, USA) acoplado a uma câmera fotográfica, modelo CCD-Iris (Sony Corp, Tokio, Japan) e um computador. O diâmetro (micrometros) das células foi determinado utilizando-se um Software (Image Pro Plus 3.0: Media Cybernetics, Maryland, USA). Foram medidos os diâmetros de 60 células por animal para cada tecido adiposo estudado (EPI e RET), num total de 5 animais por grupo, totalizando a determinação do diâmetro de 300 células por grupo.

4.12. Análise Estatística dos Dados

Para análise estatística dos dados, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e como *post-hoc*, o teste de *Tukey Kramer*, utilizando-se o programa InStat 3.0 for Windows 95 (GraphPad, San Diego, CA, USA, 1998). O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$, conferindo 95% de confiança. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1. Parte A (Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão Associada aos Produtos de Soja)

5.1.1. Peso Relativo dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal

A Figura 5 apresenta os pesos relativos dos tecidos adiposos brancos EPI e RET para ratos alimentados com diferentes dietas. Não foram constatadas diferenças significativas no peso relativo do EPI para os animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica (grupo H) quando comparados aos que se alimentaram com dieta padrão (grupo P). Do mesmo modo, nenhuma diferença foi observada para este tecido quando a dieta hipercolesterolêmica foi substituída por dieta padrão (grupo HP) comparando-se estes animais

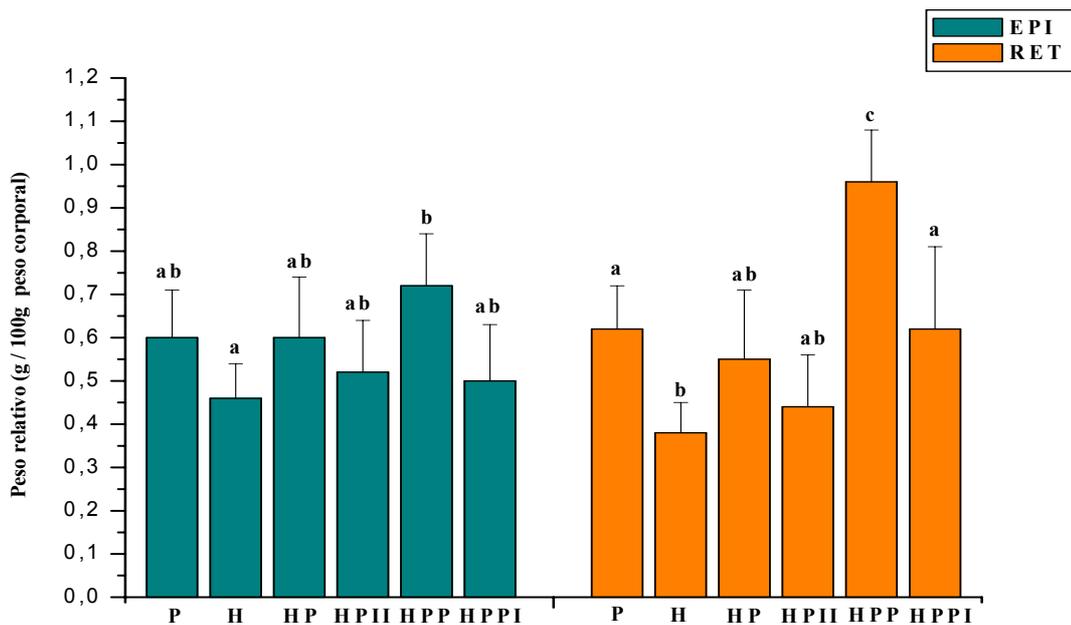


FIGURA 5 - Peso relativo dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas. Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Valores com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; HP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão; HPII = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; HPP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo; HPPI = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo suplementado com isoflavonas.

aos dos grupos H ou P. No entanto, quando a mudança de dieta foi acompanhada pela administração do iogurte de soja suplementado com isoflavonas (grupo HPPII), ou pelo placebo suplementado com isoflavonas (grupo HPPI), observa-se tendência à redução dos pesos relativos do EPI quando estes animais foram comparados aos dos grupos P e HP, porém a diferença não foi significativa. Contrariamente, foi observada tendência ao aumento no peso relativo do EPI quando a mudança de dieta foi acompanhada pela administração do placebo (grupo HPP), porém o aumento somente foi significativo quando comparado ao grupo H.

Quanto ao tecido adiposo retroperitoneal, notou-se que o grupo H apresentou peso relativo significativamente menor quando comparado ao grupo P. Não foram constatadas diferenças significativas para esta variável, quando o grupo HP foi comparado aos grupos P, H, HPPII e HPPI. No entanto, a administração do placebo concomitantemente à dieta padrão promoveu aumento significativo do RET, comparando-se os valores obtidos aos observados nos demais grupos (P, H, HP, HPPII e HPPI). Assim, as isoflavonas parecem ter evitado o aumento do peso relativo do RET, uma vez que não houve diferenças significativas para os valores obtidos para esta variável para os grupos HPPII e HPPI comparados ao grupo P e entre si. O grupo HPPI apresentou peso relativo do RET significativamente maior quando comparado ao grupo H.

5.1.2. Diâmetro dos Adipócitos dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal

A Figura 6 ilustra o efeito das diferentes dietas sobre o diâmetro das células adiposas em ratos. A ingestão da dieta hipercolesterolêmica promoveu redução significativa no diâmetro das células adiposas do EPI. Nenhuma diferença significativa foi observada para esta variável quando os grupos P e HP foram comparados.

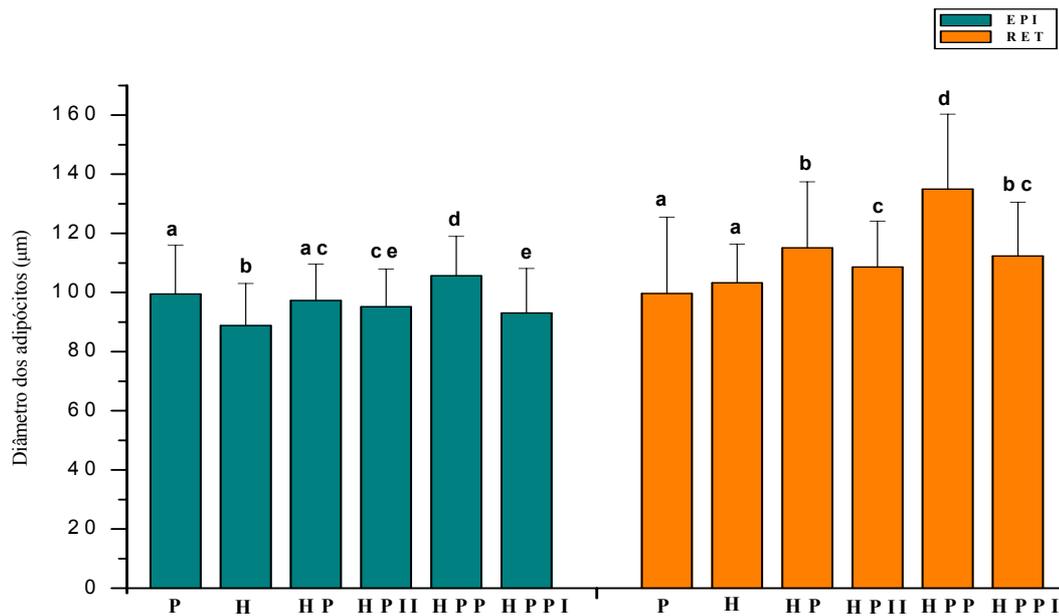


FIGURA 6 - Diâmetro dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas. Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Valores com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; HP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão; HPPII = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; HPP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo; HPPI = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo suplementado com isoflavonas.

A administração do placebo promoveu aumento significativo no diâmetro das células adiposas, quando comparadas às médias dos valores obtidos para os demais grupos (P, H, HP, HPPII e HPPI). Os grupos HPPII e HPPI apresentaram células adiposas menores, comparadas às dos grupos P e HP, porém a comparação entre os grupos HPPII e HP não apresentou diferença significativa.

Para o RET, nenhuma diferença no diâmetro dos adipócitos foi observada, quando os grupos P e H foram comparados. No entanto, a mudança de dieta (grupo HP) promoveu aumento significativo no diâmetro dos adipócitos quando a média dos valores foi comparada às obtidas para estes grupos. Assim como para o EPI, o diâmetro dos adipócitos do grupo HPP apresentou-se significativamente maior quando esta variável foi comparada aos demais grupos (P, H, HP, HPPII e HPPI). Os grupos HPPII e HPPI apresentaram células

adiposas menores, comparadas às do grupo HP. No entanto, a comparação entre os grupos HPPI e HP, não apresentou diferença significativa.

5.1.3. Ganho de Peso Corporal, Ingestão e Eficiência Alimentar, Peso Relativo do Fígado e Músculo Gastrocnêmio

Na Tabela 1 estão apresentados os valores obtidos no consumo alimentar, o ganho de peso corporal, a eficiência alimentar, assim como os pesos relativos do fígado e do músculo gastrocnêmio. Para todos os grupos, não houve diferença significativa para as variáveis: ganho de peso corporal, ingestão e eficiência alimentar e peso relativo do GAST, no período em questão. No entanto, diferenças significativas foram observadas quando o peso relativo do fígado foi comparado entre os grupos. Quanto a isto, observou-se que os animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica (grupo H) apresentaram aumento significativo

TABELA 1 - Ganho de peso corporal, ingestão alimentar, eficiência alimentar, peso relativo do fígado e músculo gastrocnêmio, em ratos alimentados com diferentes dietas.

	GRUPOS					
	P	H	HP	HPPI	HPP	HPPI
Ganho de peso corporal (g/d)	5,7 ± 0,9 ^a	5,8 ± 0,6 ^a	6,1 ± 0,4 ^a	6,2 ± 0,6 ^a	6,2 ± 0,5 ^a	5,7 ± 0,8 ^a
Ingestão alimentar [(g/d) / 100g PC]	9,3 ± 0,3 ^a	10,1 ± 0,5 ^a	9,5 ± 0,5 ^a	9,7 ± 0,4 ^a	9,3 ± 0,4 ^a	9,2 ± 0,6 ^a
E.A (%)	26,5 ± 0,5 ^a	25,5 ± 2,8 ^a	25,2 ± 1,8 ^a	26,6 ± 1,8 ^a	25,0 ± 1,5 ^a	24,7 ± 2,8 ^a
Peso fígado (g / 100g PC)	4,3 ± 0,2 ^a	6,4 ± 0,5 ^b	5,2 ± 0,3 ^c	5,4 ± 0,4 ^c	4,6 ± 0,2 ^a	4,4 ± 0,4 ^a
Peso GAST (g / 100g PC)	0,4 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,0 ^a

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Médias seguidas de mesma letra em cada linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; HP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão; HPPI = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; HPP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo; HPPI = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo suplementado com isoflavonas. EA = eficiência alimentar; PC = peso corporal; GAST = músculo gastrocnêmio.

no peso relativo médio do fígado comparado aos demais grupos. A administração do placebo (grupo HPP) e do placebo suplementado com isoflavonas (grupo HPPI) concomitante à mudança do padrão alimentar promoveu redução significativa no peso relativo deste tecido, quando comparado aos grupos que receberam o iogurte de soja suplementado com isoflavonas (grupo HPII) ou que foram submetidos somente à mudança de dieta (grupo HP). Neste caso, o peso relativo tornou-se similar aos reportados para os animais que se alimentaram com dieta padrão. Os grupos HP e HPII tiveram o peso relativo do fígado diminuído quando comparados àqueles obtidos para os animais do grupo H. No entanto, não alcançaram os valores obtidos para o grupo padrão.

5.1.4. Análises Bioquímicas no Plasma

Na Tabela 2 estão apresentadas as médias das concentrações plasmáticas dos triglicerídeos, colesterol total, HDL – colesterol e glicose, após 6 semanas.

Os animais expostos à dieta hipercolesterolêmica apresentaram aumento significativo do colesterol total e HDL-colesterol circulantes, quando comparados aos demais grupos (P, HP, HPII, HPP e HPPI). Contrariamente, redução significativa na concentração de triglicerídeos foi evidenciada nestes animais, quando comparados aos do grupo P. Contudo, para esta variável, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos P, HP, HPII e HPPI, quando comparados ao grupo P. Embora, a concentração de triglicerídeos tenha se apresentado estatisticamente maior no grupo HPP, quando comparada aos grupos H, HP e HPII, a diferença não foi significativa quando comparado aos valores observados para os grupos P e HPPI. A glicemia foi significativamente maior no grupo HP quando comparada aos valores observados nos demais grupos.

TABELA 2 – Perfil lipídico e glicemia em ratos alimentados com diferentes dietas.

Grupos	TG (mg/dl)	Colesterol Total (mg/dl)	HDL - colesterol (mg/dl)	Glicose (mg/dl)
P	99,3 ± 31,7 ^{ac}	62,7 ± 4,4 ^a	14,0 ± 2,9 ^a	117,8 ± 4,3 ^a
H	43,3 ± 13,5 ^b	89,5 ± 7,2 ^b	27,9 ± 4,8 ^b	112,4 ± 11,5 ^a
HP	74,1 ± 18,4 ^{ab}	58,4 ± 7,8 ^a	14,1 ± 2,9 ^a	144,1 ± 10,0 ^b
HPII	75,3 ± 24,0 ^{ab}	56,2 ± 6,7 ^a	14,2 ± 1,4 ^a	111,3 ± 10,5 ^a
HPP	138,2 ± 36,2 ^c	58,9 ± 11,9 ^a	15,3 ± 1,3 ^a	107,9 ± 2,4 ^a
HPPI	99,9 ± 38,4 ^{ac}	63,1 ± 6,7 ^a	14,3 ± 1,2 ^a	106,2 ± 8,2 ^a

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Médias seguidas de mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; HP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão; HPII = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; HPP = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo; HPPI = grupo dieta hipercolesterolêmica/dieta padrão + placebo suplementado com isoflavonas. TG = triglicerídeos.

5.2. Parte B (Efeitos da Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de Soja)

5.2.1. Peso Relativo dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal

A Figura 7 ilustra os efeitos das diferentes dietas sobre o peso relativo dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal em ratos. A média do peso relativo do EPI foi significativamente maior para os animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica e iogurte de soja suplementado com isoflavonas (grupo H + II) em relação aos valores obtidos para os animais dos grupos H e H + PI. Não houve diferenças significativas quando as médias dos grupos H, H + II, H + P e H + PI foram comparadas às do grupo P.

Não houve diferença significativa entre as médias dos pesos relativos obtidos para o RET, quando os animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica (grupo H) foram comparados aos alimentados com dieta padrão (grupo P). Contudo, os grupos H + II, H + P e H + PI apresentaram peso relativo do RET significativamente maior comparado aos obtidos para os animais do grupo H.

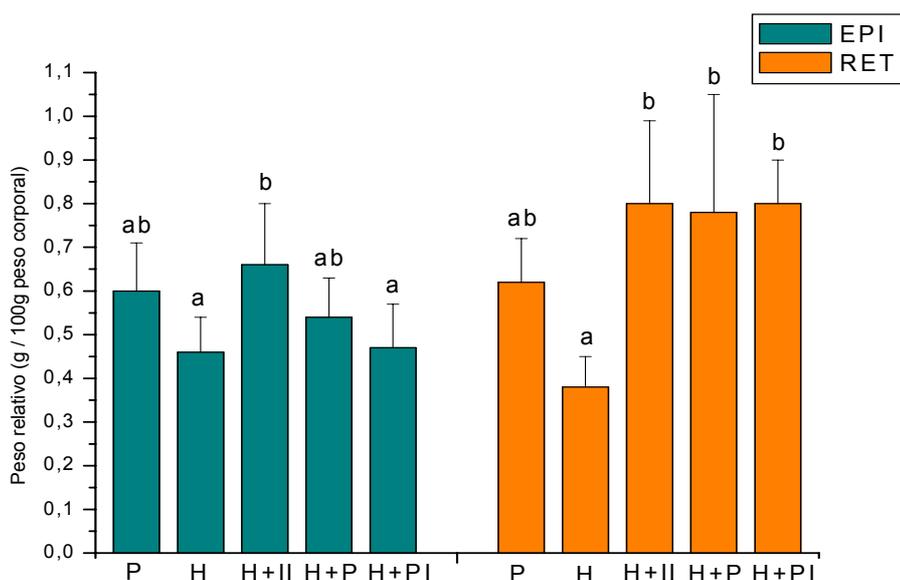


FIGURA 7 - Peso relativo dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas. Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Valores com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; H + II = grupo dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; H + P = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo; H + PI = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas.

5.2.2. Diâmetro dos Adipócitos dos Tecidos Adiposos Brancos Epididimal e Retroperitoneal

A Figura 8 ilustra os efeitos das diferentes dietas sobre o diâmetro das células adiposas em ratos. A ingestão da dieta hipercolesterolêmica promoveu redução significativa no diâmetro das células adiposas do EPI. Em adição, os grupos H + II e H + PI apresentaram células adiposas menores quando comparadas à média dos valores obtidos para esta variável nos grupos P e H+P. Contrariamente, as células adiposas deste tecido foram significativamente maiores no grupo H + P comparando-se aos demais grupos.

O diâmetro das células adiposas do RET foi significativamente maior para os grupos H + II, H + P e H + PI, comparado aos reportados para os demais grupos. Enquanto que para os animais dos grupos P e H, não houve diferença significativa entre o diâmetro das células.

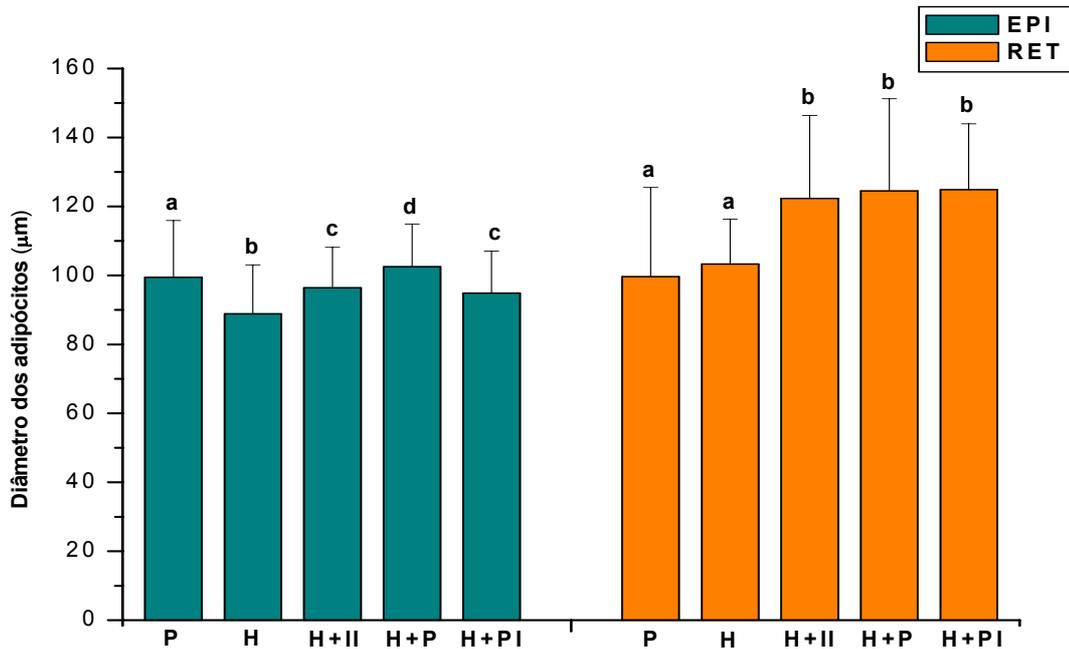


FIGURA 8 - Diâmetro dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) em ratos alimentados com diferentes dietas. Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Valores com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; H + II = grupo dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; H + P = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo; H + PI = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas.

5.2.3. Ganho de Peso Corporal, Ingestão e Eficiência Alimentar, Peso Relativo do Fígado e Músculo Gastrocnêmio

Na Tabela 3 estão apresentados os valores obtidos no consumo alimentar, no ganho de peso corporal, e na eficiência alimentar, assim como os pesos relativos do fígado e do músculo gastrocnêmio.

O ganho de peso corporal durante o período experimental não diferiu significativamente entre os grupos P, H + II, H + P e H + PI. Porém os animais dos grupos H + II e H + P apresentaram maior ganho de peso corporal quando comparados aos animais do grupo H.

TABELA 3 - Ganho de peso corporal, ingestão alimentar, eficiência alimentar, peso relativo do fígado e músculo gastrocnêmio em ratos alimentados com diferentes dietas.

	GRUPOS				
	P	H	H + II	H + P	H + PI
Ganho de peso corporal (g/d)	5,6 ± 0,8 ^{ab}	5,3 ± 0,4 ^a	6,5 ± 0,4 ^b	6,5 ± 0,4 ^b	6,2 ± 0,6 ^{ab}
Ingestão alimentar [(g/d) / 100g PC]	6,4 ± 0,1 ^a	7,3 ± 0,6 ^b	7,3 ± 0,4 ^b	6,4 ± 0,3 ^a	6,6 ± 0,3 ^a
E. A. (%)	31,3 ± 0,7 ^a	29,8 ± 2,4 ^{ab}	27,9 ± 1,6 ^b	31,1 ± 1,9 ^a	30,2 ± 1,6 ^{ab}
Peso fígado (g / 100g PC)	4,3 ± 0,2 ^a	6,4 ± 0,5 ^b	6,1 ± 0,3 ^{bc}	5,6 ± 0,3 ^c	6,00 ± 0,4 ^{bc}
Peso GAST (g / 100g PC)	0,4 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^b	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Médias seguidas de mesma letra em cada linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; H + II = grupo dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; H + P = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo; H + PI = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas. EA = eficiência alimentar; PC = peso corporal; GAST = músculo gastrocnêmio.

Os animais dos grupos H e H + II ingeriram maior quantidade de alimento quando comparados aos animais do grupo P, H + P e H + PI. Contudo, a ingestão alimentar não diferiu para os grupos P, H + P e H + PI.

Ratos expostos à dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas (H + II) apresentaram menor eficiência alimentar quando comparados aos animais dos grupos P e H+P. Não houve diferença significativa para esta variável quando os grupos P, H, H + P e H + PI foram comparados.

A média do peso relativo do GAST foi menor para os animais alimentados com dieta padrão quando comparada à média obtida para os animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Em adição, os pesos relativos do GAST dos animais que receberam dieta hipercolesterolêmica associada com os produtos de soja mantiveram-se similares aos dos animais que receberam dieta padrão, mantendo-se significativamente menores quando comparados aos valores obtidos para os animais do grupo H.

Os animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica, acompanhada ou não pela administração concomitante dos produtos de soja, apresentaram fígados maiores quando comparados aos dos animais alimentados com dieta padrão. No entanto, as médias dos pesos relativos dos fígados dos animais que receberam produtos de soja apresentaram-se menores quando comparadas àquela obtida para o grupo H, porém somente para o grupo H + P a diferença foi significativa.

5.2.4. Análises Bioquímicas no Plasma

5.2.4. 1. Concentrações plasmáticas de colesterol – total e HDL –colesterol

A Figura 9 mostra que as concentrações plasmáticas de colesterol total foram significativamente maiores nos grupos H e H + II, quando comparadas aos valores observados para o grupo P. Os animais expostos à dieta hipercolesterolêmica associada à administração do placebo (grupo H + P) ou do placebo suplementado com isoflavonas (grupo H + PI), respectivamente, apresentaram menores concentrações de colesterol plasmático quando comparados aos que receberam dieta hipercolesterolêmica associada ao iogurte de soja suplementado com isoflavonas (grupo H + II). Quanto ao HDL-colesterol, observa-se que o iogurte de soja suplementado com isoflavonas promoveu aumento significativo desta lipoproteína, quando comparada aos valores obtidos para os demais grupos. Não houve diferença significativa para a concentração plasmática do HDL – colesterol entre os grupos P, H + P e H + PI. Porém, os valores foram significativamente menores, quando estes grupos foram comparados ao grupo H.

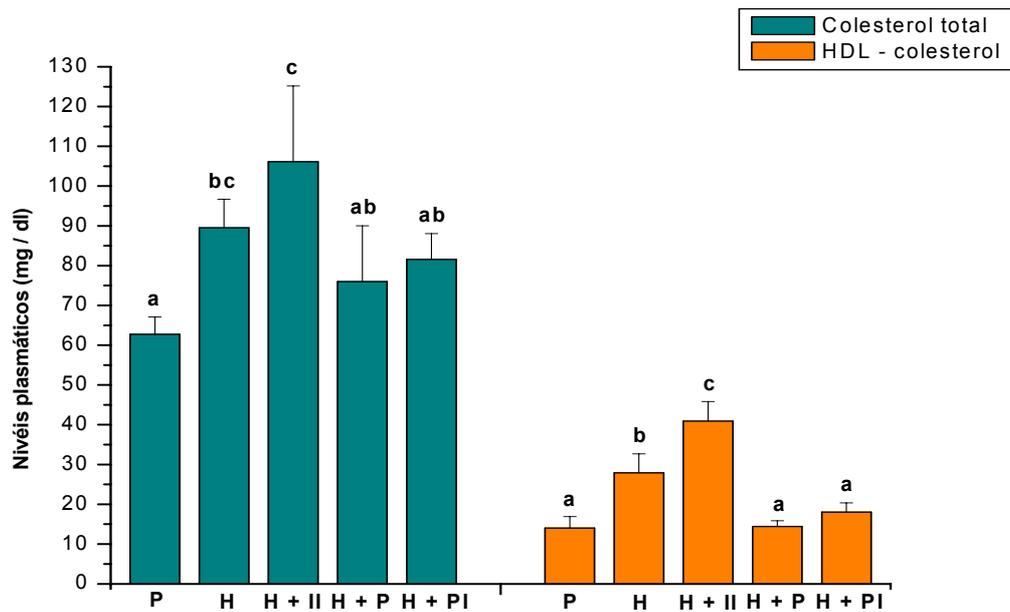


FIGURA 9 – Concentrações plasmáticas de colesterol-total e HDL – colesterol em ratos alimentados com diferentes dietas. Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Valores com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; H + II = grupo dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; H + P = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo; H + PI = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas.

5.2.4.2. Glicemia e concentração plasmática de triglicerídeos

Na Tabela 4 verifica-se que as concentrações de triglicerídeos plasmáticos foram significativamente menores para o grupo alimentado com dieta hipercolesterolêmica comparado ao grupo alimentado com dieta padrão. Não houve diferença significativa quando esta variável foi comparada entre os grupos P, H + II, H + P e H + PI. Contudo, a concentração de triglicerídeos foi significativamente maior para o grupo H + II quando comparada à média obtida para o grupo H.

A Tabela 4 apresenta ainda os valores de glicemia para os diferentes grupos. Maiores valores foram reportados para os grupos H + II, H + P e H + PI, se comparados aos obtidos para os grupos P e H, porém, a diferença foi significativa somente quando o grupo

TABELA 4 - Glicemia e concentrações plasmáticas de triglicerídeos em ratos alimentados com diferentes dietas.

	GRUPOS				
	P	H	H + II	H + P	H + PI
TG (mg/dl)	99,3 ± 31,7 ^a	43,3 ± 13,5 ^b	94,0 ± 16,3 ^a	59,5 ± 10,9 ^{ab}	86,8 ± 51,5 ^{ab}
Glicose (mg/dl)	117,8 ± 4,2 ^{ab}	112,4 ± 11,5 ^b	137,5 ± 4,6 ^c	128,1 ± 9,8 ^{ac}	122,7 ± 2,2 ^{ab}

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Médias seguidas de mesma letra em cada linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P > 0,05$). P = grupo dieta padrão; H = grupo dieta hipercolesterolêmica; H + II = grupo dieta hipercolesterolêmica + iogurte de soja suplementado com isoflavonas; H + P = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo; H + PI = grupo dieta hipercolesterolêmica + placebo suplementado com isoflavonas. TG = triglicerídeos.

H + II foi comparado aos grupos P e H, e o grupo H + P foi comparado ao grupo H. O grupo

H + PI apresentou valor de glicemia menor comparado ao valor obtido para o grupo H + II.

6. DISCUSSÃO

6.1. Parte A (Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão Associada aos Produtos de Soja)

Os resultados do presente estudo sugerem que o iogurte de soja suplementado com isoflavonas atua sobre a adiposidade em ratos jovens. Os efeitos benéficos parecem ser devido às isoflavonas, uma vez que o maior diâmetro dos adipócitos foi reportado para os animais que receberam o placebo (grupo HPP) quando comparados àqueles que receberam o iogurte de soja e o placebo, respectivamente, suplementados com isoflavonas (grupos HPPI e HPPI). Em adição, os tecidos adiposos brancos (EPI e RET), no grupo HPP também apresentaram tendência ao aumento no peso relativo, porém, somente no RET verificou-se aumento significativo quando comparado ao dos grupos HPPI e HPPI. Deste modo, o placebo exerceu um efeito negativo no tecido adiposo, por um mecanismo não identificado, mas que parece estar relacionado à presença das isoflavonas e não a compostos nutrientes. Portanto, os benefícios potenciais da soja à saúde, parecem ser dependentes do tipo de processamento ao qual a soja é submetida, de maneira que seus compostos bioativos originalmente presentes (isoflavonas), sejam mantidos. Neste contexto, os efeitos protetores da soja no tecido adiposo podem não estar presentes em todos os produtos a base de soja.

Resultados similares foram obtidos por outros pesquisadores. ALI et al. (2004), verificaram que as isoflavonas reduziram significativamente o peso do tecido adiposo epididimal em ratos magros e obesos. Em adição, NAZZ et al. (2003), reportaram que a genisteína promoveu diminuição no diâmetro dos adipócitos em ratas jovens ovariectomizadas. No estudo anteriormente citado, tais efeitos das isoflavonas sobre o tecido adiposo foram relacionados à sua similaridade estrutural com o estrogênio, de modo que, de maneira análoga a este hormônio, a ligação da genisteína aos receptores de estrógeno localizados em tecidos – alvo, neste caso, o tecido adiposo, promoveria inibição da LPL, a

qual regula a captação de lipídeos pelo adipócito (SHARPE, 1998; FARMAKALIDIS et al., 1985). O estudo realizado por NAZZ et al. (2003), demonstrou ainda que os efeitos da genisteína foram mediados pelos receptores de estrógeno do tipo α . Deste modo, embora o presente estudo tenha sido realizado com ratos, vale ressaltar que, assim como para as fêmeas, os tecidos adiposos de animais machos expressam receptores de estrógeno do tipo α . Neste sentido, COOK et al. (2001), demonstraram em ratos com deficiência deste tipo de receptor (ratos α ERKO), aumento no peso do tecido adiposo, causado tanto pela hipertrofia quanto pela hiperplasia das células adiposas.

Por outro lado, estudos prévios reportaram que a ação da genisteína em células adiposas de ratos, restringiu não somente a captação de glicose e o metabolismo à acetilCoA, mas também inibiram a lipogênese a partir de sua formação. Em adição, a genisteína aumentou a lipólise em presença ou não da epinefrina. Contudo, permanece em questão se estes efeitos podem ser verificados *in vivo* (HARMON et al., 2001; SZKUDELSKA et al., 2000), uma vez que para a observação dos efeitos *in vitro*, altas concentrações de isoflavonas (micromolar) são requeridas, se comparadas às encontradas no plasma (nanomolar) (WHITTEN & PATISAUL, 2001). Além disso, estudos reportaram que em baixas concentrações *in vitro* ($< 10\mu\text{m}$), a genisteína e outras isoflavonas atuam somente como agonistas do estrogênio, enquanto que em altas concentrações ($> 10\mu\text{m}$), a genisteína apresenta múltiplos efeitos sobre as células, em adição a atividade estrogênica (MESSINA & LOPRINZI, 2001; HSIEH et al., 1998; MARTIN et al., 1978).

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que as isoflavonas modificam a lipogênese, embora o mecanismo envolvido nesta ação não tenha sido determinado. Além disso, sugerem contribuições de outras isoflavonas em adição a genisteína, tais como a daidzeína, a gliciteína e suas formas conjugadas (genistina, daidzina e glicitina).

Os microrganismos probióticos acentuaram o efeito anti-lipogênico das isoflavonas no tecido adiposo central (RET). Deste modo, estes resultados sugerem que a microbiota pode influenciar benéficamente a biodisponibilidade das isoflavonas, como reportado previamente em estudo com animais (BOWEY et al., 2003). De acordo com a literatura, este tecido parece ter importância no desenvolvimento da resistência à insulina, dislipidemias, intolerância à glicose, hipertensão e aumento dos riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MISRA & VIKRAM, 2003).

O efeito das isoflavonas sobre o tecido adiposo não é simplesmente uma consequência da diminuição do ganho de peso corporal, uma vez que esta variável não diferiu entre os grupos. Estes resultados confirmam os obtidos por NAZZ et al. (2003) e JU et al. (2001), os quais verificaram que a dieta com genisteína não modificou o ganho de peso corporal. Além disso, o aumento do tecido adiposo em ratos deficientes em receptores para estrógeno do tipo α , não refletiu em aumento do peso corporal (COOKE et al., 2001).

Nenhuma diferença na ingestão alimentar e eficiência alimentar ocorreu entre os grupos, indicando que o consumo de ração não refletiu mudanças no tecido adiposo branco. A este respeito, estudos demonstraram que o consumo de dietas com a adição de genisteína ou com uma mistura de isoflavonas (genisteína, daidzeína e gliciteína) atuou sobre o tecido adiposo, sem interferir no consumo alimentar (ALI et al., 2004; NAZZ et al., 2003; SANTELL et al., 2000).

De acordo com NAZZ et al. (2003), o efeito inibitório da genisteína sobre o tecido adiposo, contrasta com a falta de efeito desta sobre a massa muscular, indicando que os efeitos da isoflavona são específicos ao tecido adiposo. Nossos resultados confirmam esta hipótese, à medida que nenhuma diferença foi observada no músculo gastrocnêmio, mediante a administração de diferentes dietas.

O peso do fígado foi significativamente aumentado pela ingestão da dieta hipercolesterolêmica (H), assim como, esteatose hepática macroscópica foi observada nestes animais. Em adição, decréscimos na concentração plasmática de triglicerídeos e gordura central (RET) foram reportados nos animais do grupo H se comparados aos do grupo P. Nossos resultados confirmam os obtidos por ZULET et al. (1999). A este respeito, CHEN et al (2003), especularam que o decréscimo nas concentrações de triglicerídeos circulantes pode ser devido à diminuição na síntese das VLDL no fígado, resultado da deficiência ou desequilíbrio da oferta de certos aminoácidos, tais como a lisina, mediante a ingestão de dietas hipercolesterolêmicas. Contudo, uma recente pesquisa realizada por ISLAM et al. (2005), sugeriu que camundongos com deficiência de receptor ativado por proliferadores do peroxissoma (PPAR), particularmente da isoforma α , expõem o tecido adiposo a um excesso de colesterol advindo da dieta, fato que acarretaria a perda de triglicerídeos, promovendo a redução deste tecido. Verificaram ainda que estes efeitos foram acompanhados por aumento de triglicerídeos no fígado, sugerindo que este órgão é capaz de armazenar pelo menos parte dos triglicerídeos removidos ou redistribuídos do tecido adiposo. Embora, estes efeitos tenham sido observados em animais com deficiência de receptores do tipo PPAR- α (PPAR- α null), estes autores também verificaram que a expressão deste receptor foi significativamente diminuída em animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Portanto, a regulação do tecido adiposo pela ingestão de dietas ricas em colesterol merece estudos adicionais. Neste contexto, o aumento significativo do peso relativo do fígado mediante a administração da dieta hipercolesterolêmica foi reportado por outros pesquisadores (FEOLI et al., 2003; ZULET et al., 1999).

A substituição da dieta hipercolesterolêmica pela dieta padrão foi efetiva em reduzir o peso relativo do fígado e promoveu aumento, embora não significativo, na concentração plasmática de triglicerídeos, demonstrando, portanto, a influência da dieta

hipercolesterolêmica sobre estas variáveis. O iogurte de soja suplementado com isoflavonas parece não potencializar os efeitos da mudança de dieta sobre as variáveis mencionadas anteriormente. Contudo, o placebo e o placebo suplementado com isoflavonas potencializaram a redução do peso relativo do fígado, quando comparado ao dos animais que foram submetidos somente à mudança de dieta (HP), e embora os níveis de triglicerídeos tendessem a ser maiores nos grupos HPP e HPPI, quando comparados ao grupo HP, a diferença foi significativa somente para o grupo HPP. Deste modo, o iogurte de soja suplementado com isoflavonas aparentemente não exerce efeito sobre o peso relativo do fígado, e a concentração plasmática de triglicerídeos, enquanto que os placebos modificaram estes parâmetros. No estudo realizado por ALI et al. (2005), verificou-se que as isoflavonas foram efetivas em reduzir a concentração de triglicerídeos plasmáticos em ratos machos eutróficos, porém em animais obesos, nenhum efeito foi verificado. Assim, estudos adicionais são necessários para que os efeitos dos produtos de soja e seus mecanismos de ação sejam elucidados mediante a administração da dieta hipercolesterolêmica.

A adição do colesterol à dieta promoveu o desenvolvimento da hipercolesterolemia nos animais, quando estes foram comparados aos animais alimentados com dieta padrão. Embora o HDL-colesterol tenha aumentado significativamente nos animais hipercolesterolêmicos, de acordo com MAYES (1994), animais submetidos a este tipo de dieta, apresentam a fração HDL-colesterol rica em apolipoproteína E, a qual por sua vez não é efetiva na proteção contra a aterosclerose.

A substituição da dieta hipercolesterolêmica pela dieta padrão (HP) normalizou o colesterol total e o HDL – colesterol, comparando-se os resultados obtidos aos observados no grupo padrão. Além disso, os produtos de soja administrados concomitantemente à mudança de dieta não exerceram influência sobre os níveis destas lipoproteínas. Quanto a isto, ROSSI (2000) reportou que o possível efeito hipocolesterolêmico do *E. faecium*, se deve à

inibição na absorção do colesterol proveniente da dieta. Deste modo, a substituição da dieta hipercolesterolêmica pela dieta padrão, reduziu o aporte de colesterol exógeno, o que pode justificar a falta de efeito do microrganismo probiótico, no presente estudo. Por outro lado, a ingestão de 200 ml/dia de iogurte de soja produzido com *E. faecium* e *L. jugurti*, por um período de 6 semanas promoveu aumento de 10% no HDL – colesterol em humanos normocolesterolêmicos (ROSSI et al., 2003).

Estudos de revisão bibliográfica concluíram que os efeitos dos microrganismos probióticos sobre os níveis de colesterol plasmático em homens e animais são controversos, ou seja, alguns estudos apontam para redução do colesterol mediante o consumo de tais microrganismos, enquanto outros não encontram nenhuma relação. Tal fato tem sido atribuído a fatores como a variabilidade dos protocolos experimentais (quantidade e período de ingestão dos produtos fermentados) e da população estudada, assim como a diversidade das espécies de microrganismos utilizados (GILL & GUARNER, 2004; PEREIRA & GIBSON 2002).

Do mesmo modo, alguns estudos encontraram que a ingestão de fitoestrógenos exerce efeito no controle dos lipídeos plasmáticos em humanos e animais (SANDERS et al., 2002; TAKATSUKA et al., 2000; BALMIR et al., 1996), enquanto outros relataram ausência de efeito (HODGSON et al., 1998; GOODERHAM et al., 1996). A esse respeito, o tipo de produto de soja, a duração do estudo e os métodos de administração da dieta parecem influenciar os resultados (FITZPATRICK, 2003). No entanto, de acordo com DEMONTY et al. (2003), na maioria dos estudos, o efeito hipocolesterolêmico da soja não pode ser atribuído às isoflavonas.

Observou-se aumento significativo na glicemia dos animais do grupo HP quando comparados aos demais grupos. Os produtos de soja (iogurte suplementado com isoflavonas, placebo e placebo suplementado com isoflavonas) administrados concomitantemente à dieta padrão normalizaram a glicemia dos animais em relação aos

valores observados no grupo dieta padrão. Deste modo, os produtos de soja no presente estudo contribuíram para a homeostase glicêmica. Quanto a isto, estudos de intervenção nutricional realizados com humanos e animais sugeriram que a ingestão da soja auxilia no controle da glicose. Contudo, o que permanece em questão é se o efeito benéfico se deve à composição de aminoácidos, aos constituintes não protéicos, tais como as saponinas, os inibidores de tripsina e as isoflavonas, o tipo e a quantidade de fibras consumidas, ou ainda a maneira com que os produtos de soja são consumidos (BHATHENA & VELASQUEZ, 2002). No presente estudo, as isoflavonas não parecem modificar a glicemia, uma vez que o efeito sobre esta variável também foi observado para os animais que receberam o placebo. Contrariamente, ALI et al. (2005) verificaram que as isoflavonas foram efetivas em reduzir as concentrações plasmáticas de glicose em ratos magros e obesos, efeito este mediado por mudanças na concentração de hormônios peptídicos (insulina, leptina, glucagon e corticotropina) envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos.

Os resultados encontrados nesta pesquisa não estabelecem que as isoflavonas atuam na redução do tecido adiposo em humanos, porém indicam que a concentração deste fitoestrógeno encontrada no iogurte de soja e que promove mudanças no tecido adiposo de ratos, podem ser consumidas por seres humanos como um alimento à base de soja, o qual foi fermentado por um microrganismo probiótico e suplementado com uma mistura de isoflavonas, de maneira que a concentração final atingisse a mesma encontrada no grão de soja.

A este respeito, as pesquisas apontam que o consumo de alimentos à base de soja é preferível em relação à suplementação da dieta com cápsulas, uma vez que os benefícios da soja na população oriental estão associados ao consumo destes alimentos (NAKAMURA et al., 2000). Adicionalmente, os iogurtes são populares entre crianças e

adolescentes. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação.

6.2. Parte B (Efeitos da Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de Soja)

Os resultados do presente estudo demonstraram que o iogurte de soja suplementado com isoflavonas apresentou diferentes efeitos sobre a adiposidade, os quais parecem depender da localização do tecido adiposo. Quanto a isto FRAYN (2002) reportou que a diferença na localização dos depósitos de gordura proporciona características metabólicas específicas a estes tecidos. Neste contexto, verificou-se no presente estudo que as células do tecido adiposo epididimal apresentaram os menores diâmetros, enquanto que os adipócitos do tecido retroperitoneal apresentaram-se significativamente maiores nos grupos que receberam iogurte de soja e placebo, suplementados com isoflavonas. Adicionalmente, nossos resultados sugerem que o efeito do iogurte de soja suplementado com isoflavonas pode ser modificado quando acompanhado da administração da dieta hipercolesterolêmica, fornecendo resultados diferentes daqueles obtidos anteriormente (Parte A), quando as isoflavonas presentes no iogurte de soja (grupo HPPII) ou no placebo (grupo HPPI), administradas em associação à dieta padrão promoveram a redução das células adiposas centrais (RET) e viscerais (EPI). A este respeito, estudos anteriores realizados com animais, concluíram que as isoflavonas modificam a adiposidade, no entanto, o efeito deste fitoestrógeno associado à dieta hipercolesterolêmica não foi abordado, embora algumas pesquisas apontassem para importância do colesterol na regulação do metabolismo lipídico nos tecidos adiposos brancos (ISLAM et al., 2005; ALI et al., 2004; NAZZ et al., 2003; LE LAY et al., 2001).

Como reportado anteriormente, na Parte A desse item, o tecido adiposo está sob influência do estrogênio e a similaridade estrutural das isoflavonas com este hormônio

permite sua ligação aos respectivos receptores (ALI et al., 2004; DIEUDONNE et al., 2004; NAZZ et al., 2003; PEDERSEN et al., 1991; COOKE et al., 2001). Neste contexto, uma possível hipótese é a de que a redução do diâmetro dos adipócitos do EPI nos grupos que receberam o iogurte de soja e o placebo, ambos suplementados com isoflavonas, pode estar relacionada às variações regionais na expressão dos receptores de estrogênio nos tecidos adiposos. Quanto a isto, PEDERSEN et al. (1991), demonstraram que em ratos magros o maior número de receptores para estrogênio foi encontrado no tecido adiposo epididimal, enquanto foi verificada redução significativa do número de receptores nos tecidos adiposos perirenal e subcutâneo. Os resultados obtidos por ALI et al. (2004), parecem confirmar esta hipótese, uma vez que as isoflavonas reduziram estatisticamente a adiposidade visceral (EPI) tanto em animais magros como em obesos. Estes resultados são importantes à medida que a gordura abdominal, e em particular a gordura visceral estão fortemente relacionadas à resistência a insulina, diabetes tipo 2, hipertensão e dislipidemias, levando ao aumento do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O impacto da gordura visceral no desenvolvimento destas patologias tem sido atribuído às propriedades distintas observadas neste tecido (GIORGINO et al., 2005).

O papel das isoflavonas sobre a redução do diâmetro dos adipócitos do EPI é confirmado à medida que o placebo aumentou significativamente o diâmetro destas células. O impacto negativo do placebo confirma os resultados obtidos para o Protocolo A.

Por outro lado, o aumento do peso relativo do RET e conseqüente aumento do diâmetro dos adipócitos, assim como o aumento na concentração circulante de triglicérides, mediante a administração dos produtos de soja (iogurte suplementado com isoflavonas, placebo e placebo suplementado com isoflavonas), podem representar uma tentativa de ajuste fisiológico do organismo para repor os estoques de triglicérides do tecido adiposo

retroperitoneal, uma vez tendo sido evidenciada redução de 59%, mediante a administração da dieta hipercolesterolêmica, se comparado ao dos animais alimentados com dieta padrão.

O anteriormente citado está embasado em uma hipótese desenvolvida por FRAYN (2002). De acordo com o autor, na lipodistrofia ou lipoatrofia, a função de “tampão” desempenhada pelo tecido adiposo pode ser prejudicada por não haver tecido suficiente, o que acarretaria acúmulo de triglicérides no músculo esquelético, fígado e pâncreas. Desse modo, pacientes com quantidades insuficientes de tecido adiposo também poderão desenvolver resistência à insulina e diabetes Tipo 2. Neste contexto, têm se demonstrado, que a thiazolodinediona (TZT), que atua como sensibilizador da insulina, via receptor PPAR γ , estimula a diferenciação dos adipócitos, aumentando o número das pequenas células de gordura (em ratos), estimulando assim a captação de ácidos graxos pelos adipócitos, promovendo então, a redução gradual no conteúdo de acilgliceróis em outros tecidos. A TZT também promove o ganho de peso corporal (FRAYN, 2002).

Adicionalmente, baixas concentrações de adiponectina, uma proteína plasmática específica do tecido adiposo, e que apresenta atividade anti-aterogênica, são verificadas na lipodistrofia. Deste modo, a redução no diâmetro dos adipócitos do EPI pelas isoflavonas, observados neste estudo, torna-se paradoxo ao aumento do RET. Quanto a isto, FRAYN (2002), sugere que os adipócitos dos tecidos intra-abdominais podem apresentar menor eficiência na atividade “tampão”. NAGASAWA et al. (2003) verificaram que a redução do diâmetro das células do EPI promoveu aumento na concentração plasmática de adiponectina em ratos alimentados com proteína de soja quando comparados às observadas nos animais alimentados com caseína.

Embora os resultados do presente estudo evidenciem que o produto fermentado de soja suplementado com isoflavonas apresenta efeitos sobre os tecidos adiposos, futuras pesquisas são necessárias para esclarecer os mecanismos envolvidos.

Os resultados contribuíram para a reafirmação da hipótese de que os efeitos das isoflavonas sobre o tecido adiposo não parecem ser decorrentes do ganho de peso ou da ingestão alimentar, como evidenciado na Parte A deste estudo e também por outros pesquisadores (ALI et al., 2004; NAZZ et al., 2003). A este respeito notou-se que o ganho de peso corporal reportado para os animais que receberam iogurte de soja ou placebo, ambos suplementados com isoflavonas, não diferiu dos valores reportados para os animais alimentados com dieta padrão, embora uma tendência à redução do peso relativo do EPI, com redução significativa no diâmetro de suas células tenha sido verificada nos animais que receberam a suplementação com isoflavonas (grupos H+II e H+PI) comparados aos animais que receberam dieta padrão (P). Adicionalmente não houve diferença na ingestão alimentar quando estes grupos foram comparados.

Embora os efeitos reportados para o RET tenham sido controversos aos observados para o EPI, com aumento dos pesos relativos do RET e de suas células mediante a administração dos produtos da soja, tal fato não pode ser atribuído ao ganho de peso ou à ingestão alimentar, uma vez que os valores obtidos para estes grupos não diferiram dos valores obtidos para os animais alimentados com dieta padrão, exceto para o grupo que recebeu iogurte de soja suplementado com isoflavonas. No entanto, a eficiência alimentar foi menor para este grupo quando comparada à obtida para o grupo P, não havendo a possibilidade de se determinar, neste estudo, se a menor eficiência se deu por uma menor absorção dos nutrientes, ou se alguma resposta metabólica ocorreu.

Os presentes resultados também confirmam os obtidos por ALI et al. (2004) e NAZZ et al. (2003), de que as isoflavonas da soja apresentam efeitos específicos para o tecido adiposo, uma vez que nenhuma alteração para a massa muscular foi observada mediante a suplementação com os produtos de soja, comparando-se estes valores aos obtidos para os animais alimentados com dieta padrão.

O iogurte de soja suplementado com isoflavonas e o placebo suplementado com isoflavonas administrados concomitantemente à dieta hipercolesterolêmica não apresentaram efeito na redução do peso relativo do fígado. No entanto, para o placebo (grupo H+P) menores valores foram obtidos para esta variável quando comparada à média dos pesos relativos reportados para o grupo H. Neste contexto, LIN et al. (2005), reportaram que a suplementação da dieta hipercolesterolêmica com produtos de soja administrada a ratos, por um período de oito semanas promoveu efeitos benéficos sobre o controle dos lipídeos hepáticos, efeitos estes, atribuídos principalmente às isoflavonas. Assim, futuras investigações são necessárias para verificação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Os produtos de soja não apresentaram efeito sobre as concentrações de triglicérides plasmáticos, quando os valores obtidos para esta variável são comparados aos obtidos para o grupo dieta padrão, confirmando os resultados obtidos por LIN et al. (2005).

A dieta hipercolesterolêmica promoveu o desenvolvimento da hipercolesterolemia nos animais. Neste estudo, os microrganismos probióticos (*E. faecium* CRL 183) não apresentaram efeito sobre as concentrações plasmáticas do colesterol total. Contrariamente a esses resultados, AGERHOLM-LARSEN et al. (2000a) reportaram que um iogurte produzido com uma cepa de *E. faecium* e duas cepas de *Streptococcus thermophilus* promoveu redução de 8,4% na concentração de LDL-colesterol. Adicionalmente, um estudo de meta-análise que avaliou os efeitos dos microrganismos anteriormente citados concluiu que a ingestão do iogurte produziu decréscimos de 4% e 5% no colesterol plasmático total e LDL-colesterol, respectivamente. Contudo, estes autores concluíram que há a necessidade do desenvolvimento de estudos com períodos de ingestão destes produtos mais prolongados, para que os efeitos para os lipídeos plasmáticos possam ser mantidos (AGERHOLM-LARSEN et al., 2000b).

Um importante resultado observado, foi a elevação significativa da fração HDL – colesterol pelo microrganismo probiótico *E. faecium* CRL 183, sugerindo aumento na capacidade de transporte reverso do colesterol. O mesmo foi observado por ROSSI et al. (2003) quando homens normocolesterolêmicos consumiram 200 ml/dia de iogurte de soja produzido com o mesmo microrganismo anteriormente citado.

Os produtos de soja administrados concomitantemente à dieta padrão (Protocolo A) modificaram a homeostase glicêmica. Contudo, quando os mesmos produtos à base de soja são consumidos concomitantemente à dieta hipercolesterolêmica, este efeito não foi verificado, de maneira que o iogurte de soja suplementado com isoflavonas promoveu aumento da glicemia, se comparada à obtida para o grupo alimentado com dieta padrão, enquanto que os placebos, suplementados ou não com isoflavonas não apresentaram efeito sobre esta variável. Assim, os microrganismos probióticos parecem influenciar a absorção da glicose em ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica.

Os resultados encontrados atentam para o desenvolvimento de alterações promovidas pela ingestão de dieta rica em colesterol e os efeitos que os produtos de soja podem exercer sobre as variáveis envolvidas, tais como para o perfil lipídico e adiposidade. Neste contexto, considerando seus efeitos sobre a adiposidade, os produtos de soja parecem promover uma tentativa de ajuste fisiológico mediante as alterações promovidas pela ingestão da dieta hipercolesterolêmica. Adicionalmente, o iogurte de soja suplementado com isoflavonas e com propriedades probióticas promoveu aumento significativo da fração HDL-colesterol. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação.

7. CONCLUSÃO

Os principais efeitos da administração das diferentes dietas e dos produtos de soja, observados no presente estudo serão citados, considerando os objetivos que nortearam a realização do mesmo, a saber:

7.1. Dieta Hipercolesterolêmica

A ingestão da dieta hipercolesterolêmica foi efetiva em desenvolver a hipercolesterolemia nos animais. Além disso, o colesterol mostrou-se como um fator que exerce influência sobre a adiposidade e a concentração plasmática de triglicerídeos. Estas alterações foram acompanhadas pelo aumento do peso relativo do fígado e esteatose hepática macroscópica.

7.2. Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar (Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão)

A mudança do padrão alimentar promoveu:

- Aumento do diâmetro dos adipócitos do RET;
- Redução do peso relativo do fígado, porém não alcançando os valores de normalidade obtidos para os animais alimentados com dieta padrão;
- Redução do peso relativo do músculo gastrocnêmio, alcançando os valores de normalidade obtidos para os animais alimentados com dieta padrão;
- Mudança no perfil lipídico dos animais, alcançando os valores de normalidade obtidos para os animais alimentados com dieta padrão;
- Aumento da glicemia.

7.3. Parte A (Efeitos da Mudança do Padrão Alimentar: Dieta Hipercolesterolêmica para Dieta Padrão associada aos Produtos de Soja)

- As isoflavonas promoveram a redução do diâmetro dos adipócitos para o EPI e para o RET;
- Os microrganismos probióticos parecem ter aumentado a biodisponibilidade das isoflavonas;
- O iogurte de soja suplementado com isoflavonas e com propriedades probióticas pode contribuir para a homeostase glicêmica;
- Não foram observadas mudanças no perfil lipídico dos animais frente à administração dos produtos de soja.

7.4. Parte B (Dieta Hipercolesterolêmica Associada aos Produtos de Soja)

- Os produtos de soja exerceram efeitos específicos dependendo da localização do tecido adiposo;
- As isoflavonas promoveram a redução do diâmetro dos adipócitos para o EPI;
- Os produtos de soja promoveram um aumento significativo do diâmetro dos adipócitos para o RET;
- Os microrganismos probióticos aumentaram significativamente o HDL-colesterol;
- O iogurte de soja aumentou significativamente a glicemia.

7.5. Considerações Finais

Os efeitos do iogurte de soja suplementado com isoflavonas sobre a adiposidade, perfil lipídico e glicemia, podem ser modificados, dependendo do tipo de dieta (padrão ou hipercolesterolêmica) administrada concomitantemente ao seu consumo.

Além dos efeitos benéficos das isoflavonas sobre a adiposidade, os produtos de soja também parecem promover uma tentativa de ajuste fisiológico mediante as alterações promovidas pela ingestão da dieta hipercolesterolêmica sobre esta variável. Adicionalmente, os microrganismos probióticos apresentaram efeitos dieta-específicos sobre a biodisponibilidade das isoflavonas e concentrações plasmáticas do HDL-colesterol. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de ação nos animais, e posteriormente em humanos, de maneira que a atuação dos produtos de soja como agentes fitoterápicos para controle de anormalidades do metabolismo lipídico ou como agente preventivo a estas, possa ser explorado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-GAWAD, I. A. et al. The hypocholesterolaemic effect of milk yogurt and soy-yogurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. **Int Dairy J**, v. 15, p. 37-44, 2005.

ALI, A. A. et al. Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes. **J Nutr Biochem**, v.16, n. 11, p. 693-699, 2005.

ALI, A. A. et al. Effects of soybean isoflavones, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes. **J Nutr Biochem**, v. 15, p. 583-590, 2004.

ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. Phytoestrogens and human function. **Nutr Today**, v. 32, n. 6, p. 232-239, 1997.

ANDERSON, J. W.; JOHSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **New Engl J Med**, v. 91, p. 276-282, 1995.

ANTONY, M. S.; THOMAS, B. C.; KOUNDY WILLIAMS, J. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. **Am J Clin Nutr**, v.68, p.1390S-1393S, 1998.

AKIYAMA, T. et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **J Biol Chem**, v. 262, p. 5592-5595, 1987.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 25 ago. 2005.

AGERHOLM-LARSEN L. et al. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. **Eur J Clin Nutr**, v. 54, n. 4, p. :288-297, 2000a.

AGERHOLM-LARSEN, L. et al. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term interventions studies. **Eur J Clin Nutr**, v. 54, n. 11, p. 856-860, 2000b.

ASHAR, M. N.; GILILLAND, S. E.; BUCK, L. M. Verification of hypocholesterolemic effect of fermented milk on human subjects with different cholesterol levels. **Folia Microbiol**, v. 45, p. 263-268, 2000.

BALMIR, F. et al. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. **J Nutr**, v. 126, n. 12, p. 3046-3053, 1996.

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.

- BENSON, J. R.; BAUM, M.; COLLETA, A. A. Role of TGF β in the anti-estrogen response/resistance of human breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 1, p. 381-389, 1996.
- BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends Microbiol**, v. 4, p. 430-435, 1996.
- BIANCO, N. Uma nova função para os alimentos. **Alimentos & Tecnologia**, n 87, p. 27-33, 2000.
- BONNETI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 1-6.
- BOURLIOUX, P. et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 20002. **Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 675-683, 2003.
- BOWEY, E. et al. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. **Food Chem Toxicol**, v. 41, p. 631-636, 2003.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, p. 34-47, 1986.
- CARRÃO-PANIZI, M. C. et al. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybean cultivars. **Breed Sci**, v. 48, p.409-413, 1998.
- CHEN, J. R. et al. Lipid metabolism in hipercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction. **Nutrition**, v. 19, p. 676-680, 2003.
- CHIKAI, T.; NAKAO, H.; UCHIDA, K. Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ-free rats. **Lipids**, v. 22, p. 669-671, 1987.
- CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, p. 9-15, 2005.
- COOKE, P. S. et al. The role of estrogen and estrogen receptor α in male adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**, v. 178, p. 147-154, 2001.
- CRANDALL, D. L. et al. Identification of estrogen receptor beta RNA in human breast and abdominal subcutaneous adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 248, p. 523-526, 1998.
- CUMMINGS, J. H. The large intestine in nutrition and disease. Brussels: Institute Danone, 1997, p. 15-42.
- DÂMASO, A. R. **Efeitos do exercício agudo e crônico sobre o metabolismo lipídico e a celularidade adiposa de ratas durante a lactação e 48 horas após o desmame**. 1996. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1996.

DÂMASO, A. R. et al. Obesidade e tecido adiposo endócrino. In: DÂMASO, A. R.; TOCK, L. **Obesidade: perguntas e respostas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 94-102.

DEGHAN, M.; AKHTAR-DANESH, N.; MERCHANT, A. T. Childhood obesity, prevalence and prevention. **Nutrition Journal**, 4:24, 2005.

DEMONTY, I.; LAMARCHE, B.; JONES, P. J. Role of isoflavones in the hypocholesterolemic effect of soy. **Nutr Rev**, v. 61, p. 189-203, 2003.

DIEUDONNE, M.N. et al. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 286, n. 3, p. C655-661, 2004.

DI GIROLAMO, M. et al. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. **Am J Physiol**, v. 274, p. R1460-R1467, 1998.

DUNNE, C. et al. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria human origin: correlation with in vivo findings. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p. 386S – 392S, 2001.

ERDMAN, J. W. Soy Protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. **Lipid and Lipopr Metab.**, v. 102, p.2555-2559, 2000.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 14, n. 1; p. 43-52, 2001.

FARMAKALIDIS, E.; HATHCOCK, J.N.; MURPHY, P.A. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 23, p. 741-745, 1985.

FEOLI, A. M. et al. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. **Nutrition**, v. 19, p. 789-793, 2003.

FIDGE, N. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. **J Lipid Res**, v. 40, p. 187-201, 1999.

FITZPATRICK, L. A. Soy isoflavones: hope or hype? **Maturitas**, v. 44, p. S21-S29, 2003.

FRAYN, K.N. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. **Diabetologia**, v. 45, p. 1201-1210, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **J Appl Bacteriol**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GARCIA, M. P.; CHAVES, S. B.; AZEVEDO, R. B. O tecido adiposo. In: CURI, R. et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p. 161-172.

GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, H. C. F. Fisiologia das lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992. p. 1-30.

GIANNINI, S. D. Noções gerais sobre metabolismo lipídico. In:_____. **Ateroclerose: dislipidemias**. São Paulo: BG Cultural, 1998. p. 111-118.

GILL, H.S.; GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgrad Med J**, v. 80, p. 516-526, 2004.

GIMENO, R. E.; KLAMAN, L. D. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. **Curr Opin Pharmacol**, v. 5, p. 122-128, 2005.

GIORGINO, F.; LAVIOLA, L.; ERIKSSON, J. W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. **Acta Physiol Scand**, v. 183, n. 1, p. 13-30, 2005.

GÓES-FAVONI, S. P. et al. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 24, n. 4, p. 582-586, 2004.

GONZALES, S. et al. Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. **Microbiol Alim Nutr.**, v. 8, p. 349-354, 1990.

GOODERHAM, M. H. et al. A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. **J Nutr**, v. 126, n. 8, p. 2000-2006, 1996.

HARMON, A. W.; HARP, J. B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280, p. C807- C813, 2001.

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v. 52, n. 11, p. 63-70, 1998.

HAUSMAN, D. B. et al. The biology of white adipocyte proliferation. **Obes Rev**, v. 2, p. 239-254, 2001.

HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Transporte de ácidos graxos no plasma. In: CURI, R. et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p. 59-72.

HIRSCH, J.; GALLIAN, E. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. **J Lipid Res**, v. 9, p. 110-118, 1968.

HSIEH, C. Y.; SANTELL, R. C.; HASLAM, S. Z.; HELFERICH, W. G. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v. 58, p. 3833-3838, 1998.

HODGSON, J. M. et al. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. **J Nutr**, v. 128, n. 4, p. 728-732, 1998.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Overview of gut flora and probiotics. **Int J Food Microbiol**, v. 41, p. 85-101, 1998.

ISLAM, K. K. et al. Deficiency of PPAR α disturbs the response of lipogenic flux and of lipogenic and cholesterogenic gene expression to dietary cholesterol in mouse white adipose tissue. **Biochim Biophys Acta**, v. 1734, n. 3, p. 259-268, 2005.

JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; GARSETTI, M. Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormones receptor activity—a controlled cross over trial. **Metabolism**, v. 49, p. 537-543, 2000.

JHAREIS, G. et al. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipid and immunological parameters of healthy volunteers. **Food Res Int**, v. 35, p. 133-138, 2002.

JI, Z. S. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Participate in Hepatic Lipase and Apolipoprotein E-mediated Binding and Uptake of Plasma Lipoproteins, Including High Density Lipoproteins. **J Biol Chem**, v. 272, n. 50, p. 31285-92, 1997.

JU, Y.H. et al. Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulates growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. **J Nutr**, v. 131, p. 2957-2962, 2001.

JUGE-AUBRY, C. E.; HENRICHOT, E.; MEIER, C. A. Adipose-tissue: a regulator of inflammation. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 19, n. 4, p. 547-566, 2005.

KAWAGA, A. **Standard table of food composition in Japan**. 1. ed. Tokyo: University of Nutrition for Women, 1995, p. 104-105.

KAWAKAMI, Y. et al. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. **J Nutr Biochem**, v. 16, p. 205–212, 2005.

KAWAKAMI, Y. et al. Regulative actions of dietary soy isoflavone on biological antioxidative system and lipid metabolism in rats. **J Agric Food Chem**, v. 52, p. 1764–1768, 2004.

KIESS, W. et al. Physiology of obesity in childhood and adolescence. **Curr Paediatr**, v. 16, p. 123 – 131, 2006.

KIM, H. K. et al. Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. **J Nutr**, v. 136, n. 2, p. 409 – 414, 2006.

KLAUS, S. Adipose tissue as regulator of energy balance. **Curr Drug Targets**, v. 5, n. 3, p. 1 – 10, 2004.

KONTUREK, P. C. et al. Neuro-hormonal control of food intake ; Basic mechanisms and clinical implications. **J Physiol Pharmacol**, v. 56, n. 6, p. 5-25, 2005.

KUDOU, S. et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max Merrill*). **Agric Biol Chem**, v. 55, n. 9, p. 2227 – 2233, 1991.

KREIJKAMP-KASPERS, S. et al. Dietary phytoestrogens and plasma lipids in Dutch postmenopausal women ; a cross-sectional study. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 95-100, 2005.

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

KURZER, M.S. Phytoestrogen supplement use by women. **J. Nutr**, v. 133, p. 983S–1986S, 2003.

LANGIN, D.; HOLM, C.; LAFONTAN, M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: A major regulator of lipid metabolism. **Proc Nutr Soc**, v. 55, p. 93-109, 1996.

LE LAY, S. et al. Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 20, p. 16904-16910, 2001.

LEPHART, E. D. et al. Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats. **Nutrition & Metabolism**, 1:16, 2004.

LICHTENSTEIN, A. H. Got soy ? **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 4, p. 667-668, 2001.

LIHONG, B.; SETCHELL, K. D. R.; LEPHART, E. D. Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats. **Reprod Biol Endocrinol**, 3: 58, 2005.

LIN, C. Y. ; TSAI, C. Y. ; LIN, S. H. Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 35, p. 5549-5552, 2005.

LINASSIER, C. et al. Mechanisms of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 39, p. 187-193, 1990.

LOVATI, M. R. et al. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell cultures. **J Nutr**, v. 122, p. 1971-1978, 1992.

LOVATI, M. R. et al. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **J Nutr**, v. 130, p. 2543-2549, 2000.

LOVEGROVE, J.; JACKSON, K. Coronary heart disease. In: MATILA SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional dairy products**. UK: Woodhill Publishing, 2003. p. 54-87.

LUCKEY, T. D.; FLOCH, M. H. Introduction to intestinal microecology. **Am J Clin Nutr**, v. 25, p. 1291-1295, 1972.

LUKACZER, N.D. et al. Effect of a low glycemic index diet with soy protein and phytosterols on CVD risk factors in postmenopausal women. **Nutrition**, v. 22, p. 104–113, 2006.

MACKINNON, A. M. et al. Regulation of bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes: stimulation by apoE-rich high density lipoproteins. **J. Lipid Res**, v. 28, n. 7, p. 847-855, 1987.

MANZONI, C. Subcellular localization of soybean 7S globulin in HpG2 cells and LDL receptor up-regulation by its alpha constituent subunit. **J Nutr**, v. 133, p. 2149-2155, 2003.

MARKIEWICZ, L. et al. *In vitro* bioassays of non-steroidal phytoestrogens. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 45, p. 399-405, 1993.

MARKOVITS, J. et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. **Cancer Res**, v. 49, p. 5111-5117, 1989.

MARTIN, P. M. et al. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 103, p. 1860-1867, 1978.

MARTINEZ, T. L. R. Hiperlipidemias: definição. In: QUINTÃO, E. **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992. p. 61-70.

MAYES, P. Transporte e armazenamento de lipídeos. In: MURRAY, R. K. et al. **Harper: Bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1994. p. 245-261.

MAYR, U.; BUTSCH, A.; SCHNEIDER, S. Validation of two *in vitro* test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens, and cercal extracts. **Toxicology**, v.74, p. 135-149, 1992.

MEZEI, O. et al. Hepatic cytochrome *p*450-2A and phosphoribosylpyrophosphate synthetase associated protein mRNA are induced in gerbils after consumption of isoflavone-containing protein. **J Nutr**, v. 132, p. 2538-2544, 2002.

McCARTY, M.F. Isoflavones made simple – Genistein's agonist activity for beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. **Med Hypotheses**, v. 66, n. 6, p.1093-114, 2006.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **Am J Clin Nutr**, v. 70, p. 439S-450S, 1999.

MESSINA, M. J.; LOPRINZI, C. L. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. **J Nutr**, v. 131, p. 3095S-3108S, 2001.

MILLER, N.E.; LA VILLE, A.; CROOK, D. Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high-density lipoprotein in rabbit. **Nature**, v. 13, n. 314, p. 109-111, 1985.

MIQUEL, J. et al. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr*, v. 42, n. 3, p. 289-306, 2006.

MISHRA, C.; LAMBERT, J. Production of anti-microbial substances by probiotics. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 5, p. 20-24, 1996.

MISRA, A.; VIKRAM, N. K. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. **Nutrition**, v. 19, p. 457-466, 2003.

MITAL, B. K.; STEINKRAUS, K. H. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. **J Food Sci**, v. 40, p. 114-118, 1975.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutr Rev**, v. 50, p. 438-446, 1992.

MIURA, E. M. Y. et al. Avaliação biológica de linhagem de soja com baixa atividade de inibidores de tripsina. **Rev. bras. zootec**, v. 29, n. 6, p. 1754-1758, 2000.

MORTENSEN, A. et al. Effect of a soy supplement on spontaneous atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knock out (LDLR -/-) mice. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 13, S102?, 2004.

MORI, M. et al. Soy isoflavone tablets reduce osteoporosis risk factors and obesity in middle-aged Japanese women. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 2, p. S39-S41, 2004.

NAGASAWA, A. et al. Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 311, p. 909-914. 2003.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 38, p. 13-126, 1999.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. **J AOAC Int**, v. 83, n. 3, p. 635-650, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for care and use of laboratory animals**. Revised edition. Washington: National Academic of Sciences, 1985, Publication 85-23.

NAZZ, A. et al. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. **Endocrinology**, v. 44, n. 8, p. 3315-3320, 2003.

NI, W. et al. Ethanol-extracted soy protein isolate results in elevation of serum cholesterol in exogenously hypercholesterolemic rats. **Lipids**, v. 34, p. 713-716, 1999.

OKURA, A. et al. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12] Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 157, p. 183-189, 1988.

PEDERSEN, S. B. et al. Demonstration of estrogen receptor subtypes α and β in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. **Mol Cell Endocrinol**, v. 182, p. 27-37, 2001.

PEDERSEN, S. B. et al. Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. **Biochim Biophys Acta**, v. 1093, n. 1, p. 80-86, 1991.

PÉNICAUD, L. et al. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. **Nutrition**, v. 16, p. 903-908, 2000.

PEREIRA, D. I.; GIBSON, G. R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 37, p. 259-281, 2002.

PETERSON, T.G.; KIM, H.; BARNES, S. Genistein may inhibit the growth of human mammary epithelial (HME) cells by augmenting transforming growth factor β (TGF β) signaling. **Am J Clin Nutr**, suplemento 68, 1527S, 1998.

POTTER, S. M.; PERTILE, J.; BERBER-JIMENEZ, M.D. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. **J Nutr**, v. 126, n. 8, p. 2007-2011, 1996.

PRINS, J. B.; O'Rahilly, S. Regulation of adipose cell number in man. **Clin Sci**, v. 92, p. 3-11, 1997.

QUINTÃO, E. Hiperlipidemias: Etiologia. In: _____. **Colesterol e Aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992. p. 71-123.

RASTALL, R. A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. In: WALTHAM International Science Symposium: Nature, Nurture, and the Case for Nutrition, 2003, Bangkok. **Proceedings were published as a supplement to the Journal of Nutrition**, United States: American Society for Nutrition Sciences, 2004, p. 2022S-2026S.

RODRIGUES, H. R. Manual de rotulagem. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, p.33-34, 1999.

ROSSI, E. A. Alimentos Funcionais. In: Dâmaso, A. Nutrição e exercício na prevenção de doenças. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p. 335 – 362.

ROSSI, E. A. Desenvolvimento e avaliação biológica do potencial hipocolesterolêmico de um novo produto probiótico de soja. 2000. 154 f. Tese (Livre-Docência) – Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2000.

ROSSI, E. A. et al. Quantificação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do iogurte de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2000, Porto Alegre. **Anais do XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, 812 – 815.

ROSSI, E. A. et al. Effect of a new fermented soy milk product on serum lipid levels in normocholesterolemic adult men. **Arch Latinoam Nutr**, v. 53, n. 1, p. 47-51, 2003.

ROWLAND, I. et al. Bioavailability of phyto-oestrogens. **Br J Nutr**, v. 89, p. S45-S58, 2003.

SABIN, M. A.; CROWNE, E. C.; SHIELD, J. P. H. The prognosis in childhood obesity. **Curr Paediatr**, v.14, p. 110-114, 2004.

RUIZ-LARREA, M.B.; MOHAN, A.R.; PAGANA, H. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free Rad Res**, v. 26, p. 63–70. 1997.

SANDERS, T. A. B. et al. Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extract soy protein increase HDL but not influence transforming growth factor

β_1 concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 76, p. 373-377, 2002.

SANTELL, R. C.; KIEU, N.; HELFRENIC, W.G. Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. **J Nutr**, v. 130, p. 1665-1669, 2000.

SANTOS, F. L.; FERREIRA, C. L. L. F.; COSTA, N. M. B. Modulação da colesterolemia por meio de prebióticos e probióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa, Cecília L. L. F. Ferreira, 2003. p. 61-77.

SCHAEFER, E. J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **Am J Clin Nutr**, v. 75, p. 191-212, 2002.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnol Adv**, v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998.

SETCHELL, K. D. R. Naturally occurring non-steroidal estrogens of dietary origin. In: _____. *Estrogens in the Environment II: Influences on Development*. New York: Elsevier, 1985. p.69-85.

SETCHELL, K. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr**, v. 68, p. 1333S-1346S, 1998.

SHARPE, R. M. The roles of oestrogen in the male. **Trends Endocrinol Metab**, v. 9, p. 371-377, 1998.

SHARPER, A. G. et al. Serum lipids in three o-madic tribes of other Ke ya. **Am J Clin Nutr**, v. 13, p. 135-146, 1963.

SHOREY, R. L. et al. Effects of soybean polysaccharides on plasma lipids. **J Am Diet Assoc**, v. 85, p. 1461-1465, 1985.

SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. Intestinal microflora. **Ned Clin North America**, v. 66, p. 557 – 574, 1982.

SIMONS, L. A.; AMANSEC, S. G.; CONWAY, P. Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. **Nutr Metab Cardiovas Dis**, 2006. *In Press*.

SONG, T. et al. Soy protein with or without isoflavones, soy germ and soy germ extract, and daidzein lessen plasma cholesterol levels in Golden Syrian hamsters. **Exp Biol Med**, v. 228, p. 1063-1068, 2003.

STEIN, J. H.; ROSENSON, R. S. Lipoprotein Lp (a) excess and coronary heart disease. **Arch Intern Med**, v. 157, p. 1170-1176, 1997.

SZKUDELSKA K, NOGOWSKI L, SZKUDELSKI T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 75, p. 265-271, 2000.

TAKATSUKA, N. et al. Hypocholesterolemic effect of soymilk supplementation with usual diet in premenopausal normolipidemic Japanese women. **Prev Med**, v. 31, n. 4, p. 308-314, 2000.

TEED, H. J. et al. Dietary soy containing phytoestrogens does not activate the hemostatic system in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 4, p. 1936-1941, 2005.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa, Cecília L. L. F. Ferreira, 2003. p. 35-60.

THORNBURN, J.; THORNBURN, T. The tyrosine kinase inhibitor, genistein, prevents α -adrenergic-induced cardiac muscle cell hypertrophy by inhibiting activation of the Ras-MAP kinase signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 202, p. 1586-1591, 1994.

TOOPING, D. L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asia Pacific J Clin Nutr**, v. 5, p. 15-19, 1996.

TORRES, N.; TORRE-VILLALVAZO, I.; TOVAR, A. R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. **J Nutr Biochem**, 2006. *In press*.

TULENKO, T. N.; SUMNER, A. E. The physiology of lipoproteins. **J Nucl Cardiol**, v. 9, p. 638-649, 2002.

UMLAND, E. M. et al. Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. **Pharmacotherapy**, p. 20, v. 981-990, 2000.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone content of commercial soybean foods. **J Agric Food Chem**, v. 42, p. 1666-1673, 1994.

WANG, H. J.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **J Agric Food Chem**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.

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

WU, J. et al. Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. **Metabolism**, v. 53, n. 7, p. 942-948, 2004.

YAMORI, Y. Worldwide epidemic of obesity: hope for Japanese diets. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 2, p. S2-S4, 2004.

ZULET, M. A. et al. Alterations in carbohydrate and lipid metabolism induced by a diet rich in coconut oil and cholesterol in a rat model. **J Am Coll Nutr**, v. 18, n. 1, p. 36-42, 1999.