FERNANDO PÍPOLE

**Avaliação dos efeitos tóxicos das isoflavonas da soja em
ratas ovariectomizadas. Parâmetros bioquímicos e
imunológicos**

São Paulo

2014

FERNANDO PÍPOLE

**Avaliação dos efeitos tóxicos das isoflavonas da soja em ratas ovariectomizadas.
Parâmetros bioquímicos e imunológicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Isis Machado Hueza

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3048
FMVZ

Pípole, Fernando

Avaliação dos efeitos tóxicos das isoflavonas da soja em ratas ovariectomizadas. Parâmetros bioquímicos e imunológicos / Fernando Pípole. -- 2014.
112 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Isis Machado Hueza.

1. Fitoestrógenos. 2. Estresse oxidativo. 3. Genisteína. 4. Reposição hormonal 5. Menopausa.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos possíveis efeitos imunotóxicos das isoflavonas em ratas ovariectomizadas", protocolado sob o nº 2739/2012, utilizando 480 (quatrocentos e oitenta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Dra. Isis Machado Hueza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Evaluation of possible immunotoxic effects of isoflavones in ovariectomized rats", protocol number 2739/2012, utilizing 480 (four hundred and eighty), under the responsibility Dra. Isis Machado Hueza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethical Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PÍPOLE, Fernando

Título: Avaliação dos efeitos tóxicos das isoflavonas da soja em ratas ovariectomizadas. Parâmetros bioquímicos e imunológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, **Ruth e Waldir**, pelo amor, carinho, compreensão, paciência, apoio incondicional em todos os momentos, pelos exemplos de honestidade, humildade e força de vontade que sempre transmitiram.

Espero nunca decepcioná-los

Muito obrigado por tudo! Amo muito vocês!

"Se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai"

Rui Barbosa

Aos meus irmãos, **Cesar, Eduardo e José Carlos**

Já passamos por cada situação, já tivemos brigas tão grandes e por motivos tão pequenos, mas, hoje, olhando para trás, vejo que tudo que vivemos, foi para crescermos de alguma forma. E, mesmo com nossas brigas e diferenças, sempre estivemos um cuidando do outro.

Jamais esquecerei da nossa infância e de tudo que passamos, de todos os momentos que estiveram ao meu lado, dos sorrisos, das lágrimas, da dor e da felicidade.

Muito obrigado, por tudo que representam! Tenho muito orgulho de vocês!

" Who can say where the road goes?

Where the day flows?

Only time"

Enya

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Isis Machado Hueza, por todo auxílio para elaboração deste trabalho, pelas palavras de incentivo e apoio sempre que precisei, MUITO OBRIGADO!

À Dra. Luciana Retz de Carvalho, pesquisadora do Instituto de Botânica de São Paulo, por todo carinho, conselhos e ajuda nesses 13 anos de amizade, você sempre será um exemplo para mim.

À Profa. Dra. Karin Argenti Simon, da Universidade Federal de São Paulo, pelo auxílio na realização dos experimentos de estresse oxidativo, professora, obrigado por toda paciência e dedicação.

Ao meu querido sobrinho, Vinícius, a maior alegria de nossa família. Vini, o tio ama muitooo você! Espero estar sempre por perto e dividir com você as alegrias que a vida lhe trará.

Às minhas cunhadas Andréia e Fabiane, pela convivência harmoniosa, respeito e carinho todos esses anos.

À minha prima Adriana, pelas visitas aos domingos e por todo carinho, adoro você!

Às colegas da graduação Bartira, Camila, Cintia, já se passaram 8 anos, e ainda assim, é impossível lembrar da faculdade e não pensar em vcs! Muito obrigado por tudo.

À Andréia Oliveira Latorre, não tenho palavras para expressar todo carinho que sinto por você, obrigado pela amizade, pelo auxílio em todas as horas (todas mesmo!!), pelo exemplo de competência e amor em tudo que faz!

À Luciana Castro da Cunha, minha amiga, companheira de todas as horas, estudamos juntos, trabalhamos juntos, choramos juntos, gargalhamos juntos, brigamos!!! Lú, obrigado por tudo, não tenho palavras para descrever o quanto sua amizade é valiosa para mim. Espero que ninguém nesse mundo consiga tirar o sorriso do seu rosto, ele é maravilhoso e transforma todos os lugares, todas as pessoas e todos os momentos. NÃO O PERCA NUNCA! NUNCA MUDE! Amo você.

À Fabiana Elias, a representação em "carne e osso" da frase de Nietzsche: *"O que não provoca minha morte faz com que eu fique mais forte"*. Fabi, mesmo distante continuamos a cuidar um do outro, obrigado por todo carinho e preocupação, estou sempre com você, te admiro muito e tenho muito orgulho de você, exemplo de força, coragem e perseverança. Te amo!

Ao meu grande amigo Thales Proa pela amizade verdadeira, pelo auxílio sempre que precisei, pelos conselhos nos momentos de aflição, pelas orações. *"A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você."* Thales, obrigado!

Ao meu amigo Lucas Franco, pela amizade, confiança e muitas risadas nesses anos de FMU, obrigado por tudo!

Aos demais colegas de trabalho, Cristiane Zago, Fabiana Andrielli, Fernanda Pozzi, Iara Terra, Luciano Xavier, Patrícia Staine, Regiane Miranda, Sheila Rodrigues e Solange Santos (Sol) pela convivência agradável e ajuda em todos os momentos.

À Gabriela Keller, exemplo de serenidade, educação e respeito pelo próximo, Gabi, espero que você, o Francisco e o Rafa sejam sempre muito abençoados e que nunca falte alegria na sua vida! Sei que é difícil, mas espero que a vida não nos afaste! Obrigado por tudo, adoro você!

Ao André Rinaldi Fukushima, grande companheiro desde os tempos da graduação (Embora ele não soubesse - Viva os resumos do André! Rsrtrs). André obrigado pela amizade e auxílio durante esses anos na pós. Conte sempre comigo!

Aos " Amigos Para Sempre" Andreia Latorre (*The Genius*), Camila Lima (Camilinha - *Top model*), Camila Moreira (" A Loka" da Anvisa), Juliana Vieira (Nossa médica), Luciana Cunha (Beijo no ombro) e Luciana Lippi (Estrelas) por todos esses anos de companhia, conversas, risadas, momentos de aflição (vários) apesar da distância nada irá nos separar, ao menos que, acabe o WhatsApp.

Aos demais colegas da pós-graduação, Aline Ameni, Dyanne Dutra, Esther Ricci, Fernando Ponce, Paula Lima, Patrícia Mendes, Rodrigo Vieira, Wanderlei Quinteiro pela companhia durante todos esses anos.

Aos funcionários do biotério do VPT Aline Juru, Idalina, Luciana, Mauro e Nelson, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos, por todo auxílio e ótima convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT Nicole, Herculano e Vagner, pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Às secretárias da graduação do VPT, Adriana e Milena, pelo auxílio sempre que preciso.

À secretária da pós-graduação do VPT, Teresa Cristina Aurichi, Cris você é muito especial, vou sentir sua falta! Obrigado por tudo espero que você e toda sua família seja muito feliz! Você merece!

Aos demais funcionários do VPT, Lívia, Luciano, Luciana, Marguiti, Shirley, Olivia pela ótima convivência.

A todos os funcionários da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

À todos os animais usados nestes experimentos.

E a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

PÍPOLE, F. **Avaliação dos efeitos tóxicos das isoflavonas da soja em ratas ovariectomizadas. Parâmetros bioquímicos e imunológicos.** [Evaluation of the toxic effects of soybean isoflavones in ovariectomized rats. Biochemical and immunological parameters]. 2014. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O presente estudo visou avaliar os efeitos da administração de isoflavonas da soja (ISOs) sobre parâmetros bioquímicos e atividade imunológica em ratas ovariectomizadas. As ISOs foram administradas na apresentação não isolada nas doses de 100, 300 e 900 mg/kg, por gavagem, durante 28 dias. Ao longo do tratamento foram avaliados o peso e o consumo de ração que evidenciaram efeito moderador na ingestão de alimentos e perda de peso com as maiores doses das ISOs. Foram avaliadas também a bioquímica sérica e urinária, que revelaram alteração do perfil lipídico ($\uparrow$ HDL) de forma dose-dependente, aumento de glicemia e diminuição de glicosúria, embora esta última não diferente estatisticamente do controle. No grupo de 900 mg/kg, o estresse oxidativo foi maior e caracterizado pelo aumento de glutatona oxidada (GSSG). No sistema imune foram avaliados diversos parâmetros, a saber: peso relativo de baço e timo e suas celularidades; celularidade de medula óssea; atividades de neutrófilos circulantes e macrófagos peritoneais; resposta imune do tipo tardia (DTH); fenotipagem de linfócitos T e B no sangue e baço e proliferação de linfócitos esplênicos em resposta a ConA e LPS. As maiores doses de ISOs causaram diminuição do peso absoluto do timo e aumento do peso relativo do baço, além de aumento da intensidade de fagocitose de macrófagos na dose de 900 mg/kg. Com a dose de 300 mg/kg de ISOs foi observado menor intensidade na fagocitose de neutrófilos. Assim, pode-se concluir que a utilização de ISOs, na apresentação não isolada, não induziu melhora no perfil lipídico, na proteção ao estresse oxidativo e nem alterou a capacidade de resposta do sistema imune de ratas ovariectomizadas, e, ainda, que a exposição a doses mais elevadas de ISOs apresenta potente efeito sobre a ingestão de alimentos, piora do perfil lipídico, aumento de glicemia e alteração na sinalização redox das células, portanto, futuros experimentos são necessários para melhor caracterizar os efeitos destas agliconas sobre o metabolismo dos lipídeos e também na proteção ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Fitoestrógenos. Estresse oxidativo. Genisteína. Reposição hormonal. Menopausa.

ABSTRACT

PÍPOLE, F. **Evaluation of the toxic effects of soybean isoflavones in ovariectomized rats. Biochemical and immunological parameters.** [Avaliação dos efeitos tóxicos das isoflavonas da soja em ratas ovariectomizadas. Parâmetros bioquímicos e imunológicos]. 2014. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The present study aimed to evaluate the effects of administration of soybean isoflavones (ISOs) on biochemical and immunological parameters in ovariectomized rats. For this, the ISOs were administered in non-isolated presentation at doses of 100; 300 and 900 mg/kg by gavage for 28 days. Throughout the treatment, the body weight gain and feed intake were evaluated and higher doses of ISOs showed a moderating effect on food intake and weight loss. It were also evaluated the serum and urine biochemistry, which showed altered lipid profile ($\uparrow$ HDL), increase in blood glucose and decreased glycosuria in a dose-dependent fashion, although the latter is not statistically different from the control. In the group of 900 mg/kg, the oxidative stress was higher, characterized by increased in oxidized glutathione (GSSG) levels. In the immune system several parameters were evaluated, relative weight of thymus and spleen and their cellularity, bone marrow cellularity, neutrophils and peritoneal macrophages activity, delayed type immune response (DTH), T and B lymphocytes phenotyping in the blood and spleen and splenic lymphocyte proliferation in response to ConA and LPS. Higher doses of ISOs caused decreased in the absolute thymus weight and increase in relative spleen weight. In addition, the dose of 900 mg/kg increased the intensity of phagocytosis of macrophages. On the other hand, it was observed lower phagocytic activity of the neutrophils in the group of 300 mg/kg. Thus, it can be concluded that the use of ISOs in a non-isolated presentation did not induce an improvement in the lipid profile, in the cellular protection to oxidative stress and did not alter the immune response of ovariectomized rats; furthermore, the exposure to higher doses of ISOs has potent effect on food intake, worsening lipid profile, increased blood glucose and changes in redox signaling cells, so further experiments are needed to better characterize the effects of these aglycones on the metabolism of lipids and also in protecting the oxidative stress.

Keywords: Phytoestrogens. Oxidative stress. Genistein. Hormone replacement therapy. Menopause.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	ISOFLAVONAS	19
2.2	FARMACOCINÉTICA E BIODISPONIBILIDADE	22
2.3	CONSUMO DE ISOs NO MUNDO	24
2.4	ESTRÓGENO, SEUS RECEPTORES E A MODULAÇÃO PELAS ISOs	26
2.5	PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DAS ISOs	28
2.5.1	Efeitos sobre a menopausa	28
2.5.2	Efeitos sobre o colesterol	30
2.5.3	Efeitos sobre a osteoporose	30
2.5.4	Efeitos sobre o câncer	31
2.6	ISOs E O SISTEMA IMUNE	33
3	OBJETIVO	36
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	ANIMAIS	39
4.2	REAGENTES E EQUIPAMENTOS	39
4.3	AS ISOs	41
4.4	PROCEDIMENTOS	42
4.4.1	Ovariectomia	42
4.4.2	Administração das ISOs	43
4.4.3	Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratas	43
4.4.4	Avaliação dos parâmetros hematológicos	43
4.4.5	Avaliação bioquímica	43
4.4.6	Análise da urina	44
4.4.7	Histopatologia	44
4.4.8	Órgãos linfóides	45
4.4.9	Avaliação global de células da medula óssea	45
4.4.10	Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através do <i>burst</i> oxidativo e da fagocitose	46
4.4.11	Avaliação da atividade de neutrófilos circulantes através do <i>burst</i> oxidativo e da fagocitose	47
4.4.12	Fenotipagem das subpopulações linfocíticas	48
4.4.13	Avaliação da atividade proliferativa de linfócitos	49
4.4.14	Avaliação da resposta imune celular por meio da reação de hipersensibilidade do tipo tardia – <i>Delayed Type Hypersensitivity</i> (DTH)	51
4.4.15	Parâmetros pró- e antioxidantes hepáticos	51
4.4.15.1	Parâmetros pró-oxidantes: potencial peroxidativo	52
4.4.15.2	Parâmetros antioxidantes: determinação dos níveis de glutathione total, reduzida e oxidada	52
4.4.16	Análise estatística	53
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	54
5.1	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE PESO, BEM COMO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES E SUAS CELULARIDADES DE RATAS ADULTAS	

	OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs.....	55
5.5.1	Resultados	55
5.2	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, DA BIOQUÍMICA SÉRICA, DA URINA E HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO E RINS DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs	63
5.2.1	Resultados	63
5.3	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO DE RATAS ADULTAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs	69
5.3.1	Resultados	69
5.4	EXPERIMENTO 4: FENOTIPAGEM LINFOCÍTICA: AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E T PRESENTES NO SANGUE E BAÇO DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs.....	73
5.4.1	Resultados	73
5.5.	EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs	75
5.5.1	Resultados	75
5.6	EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs.....	77
5.6.1	Resultados	77
5.7	EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS B E T ESPLÊNICOS DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS OU NÃO COM DIFERENTES DOSES DE ISOs	79
5.7.1	Resultados	79
5.8	EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (<i>DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY</i> - DTH) DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs	81
5.8.1	Resultados	81
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O termo fitoestrógeno se refere a uma classe de compostos derivados de plantas que possuem atividade estrogênica (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013). Atualmente, é sabido que centenas de alimentos possuem estes compostos. Sendo que, a maioria pertence a uma das três classes de fitoestrógenos seguintes: isoflavonas, lignanas e coumestanos (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013). As isoflavonas se destacam como sendo uma das mais importantes, uma vez que diversos povos utilizam os grãos de soja (*Glycine max*), ricos em isoflavonas, como principal fonte alimentar (SETCHELL; CASSIDY, 1999).

É atribuído a esta classe de princípios ativos naturais uma variedade de efeitos farmacológicos que variam desde a prevenção de doenças crônicas como o câncer de mama, de cólon, de útero e da próstata (CASSIDY et al., 2006; SIRIWARDHANA et al., 2013), como também a capacidade de aliviar os efeitos da menopausa e da tensão pré-menstrual, devido à semelhança estrutural destes compostos com o hormônio sexual feminino estrógeno (VITALE et al., 2012; BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013). Tal semelhança também incide sobre outros efeitos orgânicos que deixam de existir na menopausa, como por exemplo, a regulação das concentrações plasmáticas do colesterol e consequentemente a menor incidência de doenças cardiovasculares e ainda, a diminuição dos riscos de desenvolvimento de osteoporose (SETCHELL; CASSIDY, 1999; CASSIDY et al., 2006; SIRIWARDHANA et al., 2013).

Ainda, diversos autores demonstraram os efeitos imunomodulatórios destes compostos em animais e seres humanos, como por exemplo: a alteração na produção de citocinas; a expressão de receptores da resposta imune e também, a regulação de diferentes células efectoras como as células *Natural Killer* (NK), linfócitos B e T e também macrófagos peritoneais (GENG; ZHANG; LOTZ, 1993; POLKOWSKI; MAZUREK, 2000; GUO et al., 2002; KANG et al., 2007).

Entretanto, a maioria dos trabalhos destinados a avaliar os efeitos destes compostos em células do sistema imune utilizou apenas isoflavonas isoladas em cultura de células, como a genisteína ou a daidizeína, tendo sempre como principal objetivo elucidar os mecanismos de ação farmacológicos das isoflavonas (SAKAI; KOGISO, 2008; MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012).

É importante salientar que, atualmente, a população vem a cada dia buscando adquirir produtos de origem vegetal e ditos “naturais” para os mais diferentes fins, inclusive na forma de fitoterápicos em detrimento de medicamentos alopáticos, diferentes tipos de nutracêuticos, como aqueles ricos em isoflavonas, alimentos orgânicos e também alimentos à base de soja, como preventivo dos sintomas da pré-menopausa, ou mesmo como fonte de reposição hormonal. Assim, o presente trabalho visou avaliar se concentrações crescentes de isoflavonas não isoladas, ou seja, aquelas encontradas comercialmente como insumo farmacêutico, promovem alterações fisiológicas e imunológicas em ratas ovariectomizadas com o objetivo de averiguar a segurança do seu uso na tentativa de mimetizar a exposição às diferentes fontes de isoflavonas empregadas para os mais diferentes fins pelos consumidores destes produtos e seus derivados.

Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção será apresentado o estado da arte da pesquisa sobre as isoflavonas.

2.1 ISOFLAVONAS

As Isoflavonas (ISOs) constituem uma importante classe de compostos polifenólicos e pertencem ao grupo dos flavonoides; são sintetizadas a partir da via dos fenilpropanóides e fazem parte do metabolismo secundário dos vegetais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Os compostos fenólicos (ou polifenólicos) apresentam em sua estrutura um ou mais anéis aromáticos contendo substituintes hidroxílicos e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros) (CARVALHO; GOSMANN; ELOIR, 2003). Os flavonoides destacam-se deste grupo pois estão entre os mais importantes e diversificados produtos de origem natural (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

A maioria dos flavonoides possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por três anéis (C6 - C3-C6), sendo dois deles fenólicos substituídos (A e B) e um anel pirano, vicinal ao anel A. Os anéis A e C são numerados sequencialmente com algarismos arábicos e o anel B, com números arábicos seguidos por uma linha(') (Figura 1) (DI CARLO et al., 1999; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Figura 1 – Estrutura geral dos flavonóides e sua numeração

Fonte: (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003)

As ISOs têm distribuição restrita no reino vegetal, estando praticamente ausentes em algas, briófitas, fungos e pteridófitas, grupos em que mostram pouca variabilidade estrutural. Contudo, estão frequentemente presentes em angiospermas apresentando, neste grupo, enorme diversidade estrutural (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Atualmente, são conhecidos mais de 4.000 flavonóides estruturalmente diferentes (DI CARLO et al., 1999). Estes compostos, de forma geral, apresentam-se oxigenados e também conjugados com açúcares. Quando conjugados, são denominados heterosídeos, os quais podem ser O-heterosídeos, quando a ligação ao açúcar é estabelecida por uma hidroxila ou C-heterosídeos, quando essa ligação é feita por um átomo de carbono. À molécula sem o açúcar denomina-se aglicona ou genina ou ainda, "forma livre" (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Estes compostos têm importantes funções nas plantas, pois a eles vêm sendo atribuídas a proteção contra raios ultravioleta e visível (devido a capacidade de absorção de luz) e as atividades inseticida, fungicida e bactericida; também exerceriam atração de insetos e atuariam no controle da ação de hormônios vegetais, como inibidores enzimáticos e agentes alelopáticos e antioxidantes (HARBORNE; WILLIAMS, 2000)

Os flavonoides são constituintes da alimentação diária dos seres humanos pois são encontrados em diversas fontes alimentares, tais como frutas, chás, vinhos, vegetais e cereais (DI CARLO et al., 1999; HARBORNE; WILLIAMS, 2000) e também amplamente utilizados como agentes farmacológicos, pois são portadores de extensa série de atividades biológicas entre as quais estão as atividades antitumoral, antiviral, anti-hemorrágica, anti-inflamatória, antioxidante e também, a

modulação da atividade hormonal pelas ISOs (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013).

Assim como os demais flavonóides, a unidade estrutural básica das ISOs compreende dois anéis benzênicos (A e B), unidos por um anel pirrólico heterocíclico (C) (Figura 2), diferindo dos demais componentes do grande grupo dos flavonóides pela posição da ligação entre o anel B e C. Devido à capacidade de estabelecer inúmeras ligações, são conhecidas mais de 370 moléculas de ISOs (RIMBACH et al., 2008).

A soja (*Glycine max*) é uma das principais fontes de ISOs, pois produz três tipos desses compostos, em suas formas livres. Como cada uma das agliconas apresenta quatro formas isoméricas, a soja produz doze diferentes ISOs: as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os derivados glicosilados acetilados 6'' – O – acetildaidzina, 6'' – O – acetilgenisteína, 6'' – O – malonilglicitina (FLEURY et al., 1992; WANG; MURPHY, 1994; WANG et al., 1998; GRUN et al., 2001) (Figura 2).

Figura 2- Unidade estrutural básica das ISOs

Fonte: (RIMBACH et al., 2008)

Estas moléculas bioativas, quando na forma de agliconas, apresentam estrutura química similar ao estrógeno, principal hormônio sexual feminino. As características que conferem similaridade entre esses compostos são a presença do anel fenólico, imprescindível para que haja ligação com o receptor, o peso molecular e a distância equivalente (11,5 Å) entre as hidroxilas 4' e 7. (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000; CHOI et al., 2008) (Figura 3).

Desta forma, as ISOs exercem seus efeitos estrogênicos e antiestrogênicos no metabolismo, dependendo de diversos fatores, incluindo sua concentração, a

concentração de estrógenos endógenos e características individuais, tais como idade e fase da vida hormonal (BARNES; KIM, 1995; THAM; GARDNER; HASKELL, 1998)

Figura – 3- Estrutura geral das ISOs e do estradiol

Fonte: Adaptado de CASSADY et al., 2000

2.2 FARMACOCINÉTICA E BIODISPONIBILIDADE

As ISOs estão presentes nos alimentos na forma glicosilada, predominantemente como daidzina e genistina e em menor quantidade, na forma de seus precursores metilados, a biocanina A e a formononetina, juntamente com pequenas concentrações de glicetina (MURPHY et al., 1999).

No lúmen intestinal, enzimas bacterianas - principalmente as β -glicosidases- convertem grande parte dessas moléculas em agliconas. As agliconas são capazes de atravessar a membrana plasmática dos enterócitos e serem absorvidas rapidamente e em concentrações muito superiores do que sua forma heterosídica (MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012). Esse processo, varia entre indivíduos devido às diferenças na microbiota intestinal (BECK; ROHR; JUNGBAUER, 2005).

A daidzina é biotransformada em daidzeína e então em diidrodaidzeína, em seguida, em O-des-metil-angolensina (O-DMA) e equol, principal metabólito ativo das ISOs (SETCHELL; CASSIDY, 1999; SETCHELL; BROWN; LYDEKING-OLSEN, 2002). A genistina é biotransformada em genisteína, posteriormente em diidrogenisteína e então em 6-hidroxi-O-DMA- e p-etilfenol (composto inerte)

(SETCHELL; BROWN; LYDEKING-OLSEN, 2002; MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012).

O equol não é metabolizado igualmente em humanos, a capacidade individual de transformar ISOs em equol pode oferecer uma explicação para a variedade de resultados dos benefícios da dieta rica em ISOs. Acredita-se que os produtores de equol podem ser mais beneficiados do que os não-produtores (SETCHELL; CLERICI, 2010; MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012).

De modo geral, após a absorção, estas moléculas e seus metabólitos são incorporados aos quilomícrons, que distribuem as ISOs em todos os tecidos extra-hepáticos, onde irão exercer seus efeitos metabólicos, antes de retorná-las ao fígado, como quilomícrons remanescentes (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

As concentrações plasmáticas das ISOs em seres humanos elevam-se lentamente atingindo valores de Tmax em aproximadamente 5,2 e 6,6 horas, em se tratando das agliconas genisteína e daidzeína respectivamente (SETCHELL et al., 2002). Em relação ao volume de distribuição, a daidzeína apresenta uma extensa distribuição de aproximadamente 236 litros e a genisteína, de 161 litros. Entretanto, a biodisponibilidade sistêmica da genisteína (AUC média = 4,54 mg/mL/h) é maior do que a daidzeína (AUC média = 2,94 mg/mL/h) (SETCHELL et al., 2002). A meia-vida da genisteína é de aproximadamente 3,8 horas, enquanto que a daidzeína apresenta valores de meia-vida em torno de 7,7 horas (SHELNUTT et al., 2002). Uma pequena parte destas moléculas é eliminada pelas fezes (cerca de 1-2%), sendo o maior volume dessas substâncias eliminado através da urina, após a conjugação com glicuronídeos, sulfatos e acetatos no fígado (HENDRICH et al., 1994; IRVINE et al., 1998).

O tipo de suplemento ingerido influencia diretamente as concentrações plasmáticas das ISOs (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000; GENOVESE; LAJOLO, 2002; PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2005); por exemplo, os grãos de soja *in natura* são os que apresentam maior concentração de ISOs. Entretanto, é importante considerar a época, região e as condições do plantio. Um estudo realizado por Genovese, Hassimotto e Lajolo (2005) analisou a concentração de ISOs em 14 variedades de soja desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). O conteúdo de ISOs divergiu consideravelmente entre as variedades pois os valores encontrados situam-se entre

57 e 188 mg de ISOs/100g de grãos de soja, valores que correspondem a aproximadamente 82 - 91% do total de ISOs presentes no grão.

A farinha de soja tostada ou extrusada apresenta alto valor nutricional, uma vez que elimina fatores antinutricionais e aumenta a digestão proteica (COWARD et al., 1993). Entretanto, o aquecimento reduz significativamente a concentração de ISOs (VISSER; THOMAS, 1987).

O concentrado proteico é produzido a partir da farinha de soja e apresenta cerca de 70% de proteínas (ERICKSON, 1995). Este produto é obtido a partir da farinha, da qual foram extraídos os carboidratos, com soluções alcoólicas ou ácidas. Entretanto, a extração alcoólica resulta em perdas de grande parte das ISOs (FARAJ; VASANTHAN, 2004).

Assim, a escolha do tipo de suplemento a ser ingerido influencia as concentrações plasmáticas, a biodisponibilidade e os efeitos das ISOs (GENOVESE et al., 2003).

2.3 CONSUMO DE ISOs NO MUNDO

A soja pertence à família Fabaceae (leguminosa), assim como o feijão, a lentilha e a ervilha, é originária da China (HERMANN, 1962; BONATO; BONATO, 1987). É empregada na alimentação, sobretudo na indústria de óleos comestíveis. É um grão rico em proteínas, cultivado como alimento tanto para humanos quanto para animais (TEIXEIRA, 1998; EMBRAPA, 2014a). Contém apreciável teor de minerais dentre os quais estão o potássio, o cálcio, o magnésio, o fósforo, o cobre e o zinco. É fonte de algumas vitaminas do complexo B, como a riboflavina e a niacina, e também de vitamina C. Além destes nutrientes, a soja é extremamente rica em ISOs (EMBRAPA, 2014a).

Há séculos, os países asiáticos têm sua dieta baseada no consumo da soja e de seus derivados. Recentemente, esse hábito alimentar vem sendo incorporado pelos povos ocidentais, não somente devido à riqueza de sua proteína vegetal, mas também pelos possíveis benefícios das ISOs (LEE et al., 1991; ADLERCREUTZ, 1995; BARNES; KIM, 1995; STARK; MADAR, 2002). Em levantamento realizado por

Lu e colaboradores (2000), constatou-se que a população asiática que emigrou para países do ocidente e adotou seus hábitos alimentares, apresentou risco maior de desenvolver câncer de mama e próstata, comparados aos habitantes do país de origem (LU et al., 2000)

Estima-se que o consumo de soja e de ISOs pelos orientais seja de aproximadamente de 6 a 11 gramas por dia e de 50 a 100 miligramas por dia, respectivamente. Em algumas regiões, o consumo chega a ser superior a 25 gramas de soja e 100 miligramas de ISOs, por dia (MESSINA; NAGATA; WU, 2006)

Os grãos de soja e seus derivados constituem, juntamente com outras leguminosas (feijão, lentilha, ervilha, grão-de-bico), uma das principais fontes de proteínas da dieta vegetariana e “vegana¹” (TANTAMANGO-BARTLEY et al., 2013). Os benefícios das proteínas da soja e de uma dieta livre de proteína animal seriam a diminuição da incidência de câncer, o melhor controle dos níveis de colesterol e conseqüentemente, o menor desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TANTAMANGO-BARTLEY et al., 2013).

Entretanto, essa substituição é causa de controvérsia e divide opiniões na classe científica pois, enquanto diversos trabalhos demonstram as vantagens da substituição das proteínas de origem animal pelas proteínas da soja, outros autores demonstram claramente a deficiência de aminoácidos e de vitaminas essenciais, ocasionadas pela não ingestão de uma dieta geral (O'NEILL, 2010).

Apesar da soja não ser a única fonte de proteína disponível em substituição à proteína da carne, “veganos” e vegetarianos consomem gramas de proteína de soja diariamente (O'NEILL, 2010; TANTAMANGO-BARTLEY et al., 2013).

Ainda, com relação à substituição de proteínas de origem animal, destaca-se o grande consumo de leite de soja por crianças (PATISAUL; JEFFERSON, 2010). Estima-se que 25% das crianças norte-americanas consumam leite de soja diariamente, devido à adoção da dieta vegetariana pelos pais, ou principalmente, à alergia ao leite materno ou animal (KLISH et al., 1998). Por esta razão, crianças consomem cerca de 6-9 mg de ISOs/kg de peso corporal/dia, quantidade sete vezes maior do que a ingerida por um adulto norte-americano (YELLAYI et al., 2003).

¹ Segundo o site da Sociedade Americana de Veganismo, o Veganismo é o modo de vida que busca eliminar toda e qualquer forma de exploração animal, ou seja: da alimentação, do vestuário, dos testes pré-clínicos, do trabalho, do entretenimento e do comércio. Veganos opõem-se à caça e à pesca, ao uso de animais em rituais religiosos ou a qualquer outro uso que deles se faça. (<http://www.americanvegan.org/vegan.htm>).

Em decorrência disto, lactentes alimentados com formulas à base de soja têm concentrações circulantes de fitoestrógenos cerca de 13.000-22.000 vezes maior do que os seus próprios níveis de estrógeno endógeno (WHITTEN; PATISAUL, 2001).

Estas concentrações plasmáticas são suficientemente elevadas para produzir muitos dos efeitos fisiológicos observados em animais e adultos humanos tais como menarca precoce e o desenvolvimento de características sexuais secundárias (KLISH et al., 1998; WHITTEN; PATISAUL, 2001).

Apesar do significativo aumento do consumo de soja no ocidente, seu consumo ainda é muito baixo, quando comparado ao dos povos orientais. Por exemplo, o consumo médio de soja nos Estados Unidos, maior produtor de soja do mundo, é de aproximadamente 0,89 gramas por dia e o de ISOs, não ultrapassa 0,68 miligramas por dia (HAYTOWITZ; BHAGWAT, 2009)

No Brasil, não há números oficiais sobre o consumo dessa oleaginosa e de seus princípios ativos. A maior parte da soja produzida aqui é destinada à produção do óleo de soja e também à alimentação animal, através da produção do farelo de soja (EMBRAPA, 2014b).

Os diversos estudos sobre os benefícios da soja e a demanda de pessoas interessadas em cuidar da saúde, principalmente de mulheres após a menopausa, causaram um apreciável incremento na produção de alimentos fortificados e de suplementos à base de ISOs, nas indústrias alimentícia e de medicamentos (GENOVESE et al., 2003; CHOI; RHEE, 2006)

2.4 ESTRÓGENO, SEUS RECEPTORES E A MODULAÇÃO PELAS ISOs

O estrógeno regula o metabolismo celular em vários tecidos, desempenhando um papel importante no desenvolvimento, crescimento e diferenciação das características sexuais secundárias femininas, na reprodução e no metabolismo celular (CLARK; ERNEST, 1979; KORACH, 1994). Essas ações ocorrem por meio da interação dos hormônios com seu respectivo receptor (EVANS, 1988; CARSON-JURICA; SCHRADER; O'MALLEY, 1990; TSAI; O'MALLEY, 1994).

Atualmente, duas isoformas de receptores para estrógenos são conhecidas: o receptor estrogênico α (RE α) (GREENE et al., 1986; KRUST et al., 1986; WHITE et al., 1987) e o receptor estrogênico β (RE β) (KUIPER et al., 1996; MOSSELMAN; POLMAN; DIJKEMA, 1996; OGAWA et al., 1998). Estes receptores são membros da superfamília dos genes que compreendem receptores nucleares de diversos ligantes, como os hormônios esteroides (estrógeno, progesterona, glicocorticoides, mineralocorticoides), ácido retinoico (vitamina A), vitamina D, prostaglandina e hormônios da tireoide (EVANS, 1988; BEATO, 1989; GRONEMEYER, 1991).

Ambos os receptores α e β estão expressos em diversos tecidos do organismo porém, a expressão em determinadas regiões é predominante, em relação as demais. Por exemplo, o RE α é predominantemente expresso na mama, útero e na vagina, estando envolvido principalmente na regulação do processo reprodutivo (ENMARK; GUSTAFSSON, 1999). Em contrapartida, o ER β é expresso nos mesmos tecidos que o ER α e também nas células epiteliais do ovário, rins, cérebro, ossos, coração, pulmões, próstata e células epiteliais (ARTS et al., 1997; ENMARK; GUSTAFSSON, 1999). Ainda, ambos receptores, são encontrados em uma grande variedade de células imunológicas tais como: tímócitos, monócitos e linfócitos T e B (OLSEN; KOVACS, 1996; MARTIN, 2000).

Devido à vasta distribuição destes receptores no organismo, diferentes funções são desempenhadas por eles em relação à ativação gênica e principalmente, na manutenção da homeostase dos sistemas imunológico, esquelético, cardiovascular e nervoso (KUIPER et al., 1997; ENMARK; GUSTAFSSON, 1999).

Entretanto, essa versatilidade e intensa capacidade de ativação/inibição de inúmeros genes, enzimas e linhagens celulares podem favorecer o aparecimento de doenças estrógeno-dependentes, tais como, o mioma, a endometriose e principalmente o câncer de mama (ROSSELLI et al., 2000; DEROO; KORACH, 2006). Doenças estrógeno-dependentes são aquelas que se desenvolvem devido ao aumento da concentração de estrogênio na corrente sanguínea e consequentemente nos tecidos, fator comum em mulheres em idade reprodutiva (DEROO; KORACH, 2006).

As ISOs são capazes de modular respostas estrógeno-dependentes não só devido à similaridade molecular com o estrógeno como também, devido à afinidade

de ligação aos receptores ER α e ER β (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000; RICKETTS et al., 2005). A proporcionalidade desta afinidade é de 1/20 para os receptores α e de 1/3 para os receptores β , sendo evidente então, uma maior afinidade destes compostos com os receptores ER β (CLAPAUCH et al., 2002).

A atividade estrogênica das ISOs é extremamente mais fraca quando comparada ao estrógeno endógeno (CLAPAUCH et al., 2002). Entretanto, deve-se ressaltar que as mesmas, por apresentarem ação diferenciada e competitiva sobre os receptores estrogênicos podem exercer significativo efeito na modulação desses receptores. Assim, a eficácia das ISOs associa-se não só à quantidade de estrogênio disponível, mas também à quantidade de receptores saturados, podendo-se obter tanto ações pró quanto antiestrogênicas, ou seja, quando os receptores estão livres devido à baixa quantidade de estrógeno circulante, as ISOs podem ocupar tais receptores, promovendo ação estrogênica agonista. Contudo, quando os níveis de estrógeno estão elevados, as ISOs competem pelos receptores, diminuindo a ação estrogênica e antagonizando os efeitos da estimulação estrogênica (WOOD et al., 2006; MOUTSATSOU, 2007).

2.5 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DAS ISOs

Nesta seção serão apresentadas as principais propriedades terapêuticas das ISOs.

2.5.1 Efeitos sobre a menopausa

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a menopausa é o término permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana fisiológica, com declínio da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona (WHO, 1996). Esse quadro pode ocorrer naturalmente ou ser induzido por cirurgia, quimioterapia ou radiação (COX; LIU, 2014; KASUM et al., 2014). A menopausa natural é

reconhecida pela ausência de períodos menstruais por 12 meses consecutivos, ausência essa não associada à causas fisiológicas como a lactação ou ainda à causas patológicas (GUYTON; HALL, 1998).

A diminuição fisiológica da atividade ovariana causa mudanças desfavoráveis no metabolismo da mulher, que incluem alterações nos lipídeos e nas lipoproteínas, na distribuição da gordura corpórea, no metabolismo da glicose e da insulina e no sistema de coagulação/fibrinólise. Pode, também, em algumas mulheres, provocar ondas de calor, acompanhadas de transpiração, tonturas e palpitações, além de suores noturnos, prejudicando o sono. São comuns, também, a depressão e a irritabilidade; alterações nos órgãos sexuais, como coceira e secura da mucosa vaginal; distúrbios menstruais; diminuição da libido; desconforto durante as relações sexuais e maior chance de desenvolvimento de osteoporose (WHO, 1996; LINDAHL, 2014; MOREIRA et al., 2014).

As ondas de calor ou fogachos são considerados a “marca registrada” da deficiência estrogênica; ocorrem de repente, em geral na parte superior do tórax, pescoço e rosto, sendo desencadeadas por situações estressantes e ingestão de bebida quente. Esses sintomas, por intervirem nas atividades cotidianas e na qualidade do sono, levam a uma alteração na qualidade de vida. (GIACOMINI; MELLA, 2006). A baixa concentração de estrogênio circulante é a principal causa dessa sintomatologia, uma vez que o estrógeno interfere com a neuroquímica cerebral (MCEWEN; ALVES, 1999; RAZ, 2014).

A terapia de reposição hormonal a base de ISOs vem se mostrando eficaz na diminuição dos sintomas da menopausa, pois mulheres que se alimentam de soja apresentam redução de aproximadamente 90% desses sinais, demonstrando que a soja e seus princípios ativos, as ISOs, podem ser consideradas uma alternativa eficaz na reposição hormonal, na menopausa (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013; SIRIWARDHANA et al., 2013; MOREIRA et al., 2014).

2.5.2 Efeitos sobre o colesterol

Diversos estudos, conduzidos principalmente em populações asiáticas que consumiam altas taxas de alimentos ricos em ISOs, mostraram uma baixa incidência de doenças cardiovasculares (GOODMAN-GRUEN; KRITZ-SILVERSTEIN, 2001; GIL-IZQUIERDO et al., 2012). Vários mecanismos são propostos para a ação das ISOs no aparelho cardiovascular, como o aumento da secreção de ácidos biliares (POTTER; PERTILE; BERBER-JIMENEZ, 1996), a ação direta em receptores estrogênicos (DAVIS; MURKIES; WILCOX, 1998), a autorregulação dos receptores de colesterol (GONZALEZ-GRANILLO et al., 2012) e o aumento dos níveis de tiroxina, o que favorece a diminuição dos níveis de colesterol (BALMIR et al., 1996; POTTER; PERTILE; BERBER-JIMENEZ, 1996).

Além disso, as ISOs atuam como poderosos agentes antioxidantes (SETCHELL; CASSIDY, 1999; LIU; CHANG; WIESENBERN, 2005; SETCHELL; CLERICI, 2010), aumentando a resistência à oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e consequentemente ao processo trombótico e à proliferação de células musculares lisas, nas paredes das artérias (PARK; HUANG; FRISHMAN, 2005). Por outro lado, é importante ressaltar, que o aumento do consumo de produtos de soja está ligado, na maioria das vezes, a uma dieta pobre em alimentos ricos em gorduras saturadas e em colesterol. Sendo assim, esses produtos exercem um efeito indireto na redução do colesterol sanguíneo.

2.5.3 Efeitos sobre a osteoporose

Em relação aos efeitos das ISOs sobre a osteoporose, diversos estudos epidemiológicos sugerem que as populações que possuem dieta rica em soja apresentam redução do *turnover* ósseo e consequentemente, menor incidência de osteoporose do que aquelas onde o consumo de soja é menor (POTTER et al., 1998; ALEKEL et al., 2010; PATISAUL; JEFFERSON, 2010). Acredita-se que os

osteoblastos e os osteoclastos são células-alvo da ação da genisteína e da daidzeína uma vez que seus receptores podem ligar-se a estes princípios ativos.

A genisteína induz a apoptose de osteoclastos, por meio da inibição das proteínas tirosina quinase (PTK). Estas proteínas são fundamentais para a atividade dessas células (osteoclastos), o que torna seus inibidores possíveis candidatos à prevenção da osteoporose (GAO; YAMAGUCHI, 2000; YAMAGUCHI; GAO-BALCH, 2013). Além disso, estudos demonstraram que a estimulação dos osteoblastos pelas ISOs é maior do que a inibição dos osteoclastos, promovendo, assim, crescimento ósseo distinto daquele desencadeado pelo estrógeno (VIERECK et al., 2002; NIKANDER et al., 2004).

2.5.4 Efeitos sobre o câncer

Vários estudos também têm demonstrado os efeitos das ISOs da soja, especificamente da genisteína e da daidzeína, no tratamento de diversos tipos de cânceres, tais como o de colón, o de mama e o da próstata. Entre os mecanismos propostos para a atividade anticarcinogênica destes compostos destacam-se: a atividade moduladora estrogênica/antiestrogênica, a atividade antiproliferativa, a ação sobre a atividade celular através da inibição das proteínas tirosina-quinase e topoisomerase II, ocasionando a parada do ciclo celular e apoptose, a prevenção da oxidação, a indução de enzimas de detoxificação, a regulação imunológica, a inibição da angiogênese e as mudanças na sinalização celular (CONSTANTINOU; HUBERMAN, 1995; BARNES et al., 2000; BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; BELLOU et al., 2012).

Estudos *in vitro* demonstraram a influência das ISOs sobre o crescimento de vários tipos de células cancerosas, tanto hormônio-dependentes quanto não hormônio-dependentes (KUMI-DIAKA et al., 2006; HELFERICH; ANDRADE; HOAGLAND, 2008). Trabalhos conduzidos com células de câncer de mama MCF-7 mostraram que altas concentrações de ISOs, principalmente a genisteína, reduzem a proliferação celular, enquanto que baixas concentrações exercem efeito

estimulatório sobre a proliferação das células MCF-7 (ALLRED et al., 2001; CHEN et al., 2003; CHEN; WONG, 2004; SHIM et al., 2007; LUCKI; SEWER, 2011).

Já em relação aos experimentos *in vivo*, diversos autores relatam os efeitos das ISOs sobre o desenvolvimento dos tumores. Applet e Reicks (1999) observaram que a administração de genisteína em ratas aumentou as defesas antioxidantes mas não inibiu o câncer de mama induzido por dimetilbenzantraceno (DMBA).

Outro estudo, conduzido por Zhou et al. (1998) demonstrou que a habilidade das ISOs em interferir no ciclo celular, apoptose e angiogênese diminuiu a formação de tumores na bexiga de camundongos expostos a esses compostos. Entretanto, a administração de genisteína em ratos imunodeficientes não foi capaz de inibir o surgimento de tumores mamários.

Estudos epidemiológicos com homens japoneses (SEVERSON et al., 1989) e adventistas do 7º dia (JACOBSEN; KNUTSEN; FRASER, 1998), associaram o consumo de tofu e leite de soja ao surgimento do câncer de próstata. Ambos os trabalhos demonstraram a redução do risco de tumores na próstata em 65 e 70% respectivamente. Entretanto, sabe-se que durante o processamento do leite de soja, cerca de 92% das ISOs são degradadas (ROSSI et al., 2004), o que recomenda cautela na apreciação destes resultados.

O provável mecanismo de ação das ISOs nos tumores de próstata estaria relacionado à capacidade que estes compostos possuem de diminuir os níveis de testosterona e o peso da próstata (WEBER et al., 2001), pois a genisteína promove a regulação negativa de andrógenos e de receptores estrogênicos, na próstata de ratos. (FRITZ et al., 1998)

Devido a habilidade das ISOs demonstrarem atividade estrogênica em baixo ambiente estrogênico e atividade antiestrogênica em alto ambiente, esses autores sugerem que estes compostos possuem potencial para proteger contra o câncer de mama antes da menopausa e se comportar como agentes pró-câncer após a menopausa (baixo ambiente estrogênico) (LEE et al., 1991; WANG; SATHYAMOORTHY; PHANG, 1996; HSIEH et al., 1998).

Resultados conflitantes como os obtidos até o momento não são passíveis de serem facilmente interpretados e mostram a necessidade da continuidade de estudos nesta linha, para que os efeitos antineoplásicos ou pró-neoplásicos das ISOs sejam melhor caracterizados.

2.6 ISOs E O SISTEMA IMUNE

As células dos sistemas imunológico e endócrino apresentam receptores para citocinas, hormônios e neurotransmissores. Desta forma, mediadores endócrinos podem modular o sistema imune e mediadores imunes podem afetar estruturas do sistema endócrino. De fato, é impossível negar que há uma interação marcante entre os sistemas imune e endócrino (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

O estrógeno é um importante modulador da resposta imune: este hormônio, em concentrações fisiológicas, é capaz de estimular a produção de imunoglobulinas, promover ou inibir a proliferação de linfócitos T e a diferenciação, proliferação e sobrevivência dos linfócitos B (GROSSMAN, 1985; WILCZYNSKI, 2010b). Ainda, estudos clínicos têm mostrado que o estrógeno deprime a imunidade celular, suprime a atividade das células *natural killer* (NK), diminui a produção de TNF- α , aumenta a produção de anticorpos e ativa macrófagos através da maior produção de IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, INF- α e TNF- α (GROSSMAN, 1985; SCHUURS; VERHEUL, 1990; WILCZYNSKI, 2010b, a).

Sabe-se, por exemplo, que a maioria das doenças autoimunes são mais comuns em mulheres e se iniciam geralmente em condições de mudanças dos níveis de estrógeno, como puberdade, menopausa e gravidez (SCHUURS; VERHEUL, 1990; CUTOLO et al., 2006)

De fato, alguns estudos realizados *in vivo* e principalmente *in vitro* vêm mostrando que a genisteína, a principal ISO da soja e de seus derivados, possui vários efeitos sobre células e órgãos do sistema imune, tais como a diminuição do peso relativo do timo e o aumento da apoptose de timócitos de camundongos (YELLAYI et al., 2002); diminuição na produção de óxido nítrico, por macrófagos, em cultura (SHEU; LAI; YEN, 2001); diminuição da proliferação de linfócitos e da síntese do leucotrieno B₄ (ATLURU; JACKSON; ATLURU, 1991); diminuição dos níveis de citocinas (GENG; ZHANG; LOTZ, 1993), e ainda, diminuição da atividade citotóxica de linfócitos T e NK (POLKOWSKI; MAZUREK, 2000), evidenciando o potencial efeito imunomodulador deste composto, à semelhança do estrógeno

Diversos autores demonstraram os efeitos das ISOs sobre a atividade das células dendríticas *in vitro*. Por exemplo, sabe-se que a genisteína diminui a

expressão de receptores do tipo toll dependentes de IL-6 em monócitos humanos, sem afetar os demais eventos orquestrados por esta citocina (DIJSSELBLOEM et al., 2007) e que estas agliconas possuem a capacidade de diminuir a resposta imune de células dendríticas, frente a exposição ao antígeno da cólera (MASILAMANI et al., 2011)

As ISOs também atuam diminuindo a resposta alérgica, atuando em mastócitos e basófilos, inibindo a liberação de histamina através do bloqueio do receptor de membrana dessas células para IgE (LAVENS; PEACHELL; WARNER, 1992). Tanto a genisteína quanto a daidzeína são capazes de inibir a resposta alérgica de camundongos, utilizados como modelo de asma (BAO et al., 2011).

Em relação aos macrófagos, estes compostos bioativos apresentam a capacidade de inibir a produção de óxido nítrico destas células *in vitro* (SHEU; LAI; YEN, 2001). E, tanto a daidzeína quanto a genisteína interferem na sinalização mediada pelo NFκB, inibindo a síntese de óxido nítrico (CHOI et al., 2003). O equol, quando administrado em modelo animal, diminui a produção de TNFα de macrófagos peritoneais de ratos infectados com LPS; entretanto, este efeito sobre TNFα parece não estar relacionado à atividade estrogênica exercida pelo equol (KANG et al., 2005; KANG et al., 2007).

Um estudo conduzido por Tyagi et al. (2011) demonstrou que camundongas ovariectomizadas, que receberam daidzeína pela via oral, apresentaram reversão dos efeitos da queda de estrógenos circulantes, tais como, aumento da celularidade da medula óssea, aumento das populações de linfócitos T CD4+ no baço, maior produção de TNFα e aumento da circulação e da produção de linfócitos B.

A administração subcutânea de genisteína no mesmo modelo animal resultou na redução do peso do timo, na indução da morte de timócitos, com consequente atrofia tímica e inibição da resposta imune celular do tipo tardia (DTH), (YELLAYI et al., 2002).

Entretanto, nem todos os parâmetros imunológicos são inibidos pelas ISOs. Sabe-se que a administração de daidzeína pela via oral, foi capaz de aumentar o peso relativo do timo e o número de linfócitos circulantes (ZHANG; LI; WANG, 1997) e que a genisteína foi capaz de aumentar a resistência do hospedeiro a tumores, devido ao aumento da citotoxicidade das células NK e dos linfócitos T (BAEZA et al., 2007; BAEZA et al., 2010). Da mesma forma, a administração oral de equol

aumentou a produção de IgE e IL-13 de esplenócitos de camundongas Balb/c ovariectomizadas (SAKAI et al., 2010).

A popularidade da soja, dos suplementos alimentares com ela elaborados e de seus princípios ativos (ISOs), aliada ao conhecimento do repertório de efeitos sobre as células do sistema imune, propiciaram o surgimento de diversos trabalhos que apontam os benefícios e as possíveis aplicações desta leguminosa e de suas substâncias ativas, no tratamento de várias desordens imunológicas, tais como alergias, doenças inflamatórias crônicas como a colite e até mesmo doenças autoimunes (MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012). Entretanto, para o melhor entendimento e para a validação dos benefícios destes compostos, serão necessários estudos mais controlados e aplicados tanto de atividade farmacológica quanto de segurança toxicológica.

Esta constatação, associada ao fato de as ISOs serem amplamente empregadas por mulheres na menopausa e ao conhecimento do efeito destas substâncias isoladas sobre células do sistema imune, referenda o principal objetivo deste trabalho de pesquisa, que foi avaliar os efeitos das ISOs sobre alguns parâmetros bioquímicos e do sistema imune, em ratas ovariectomizadas.

Objetivos

3 OBJETIVO

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da administração das ISOs da soja, disponíveis comercialmente no mercado, em parâmetros bioquímicos e de atividade do sistema imune, em modelo experimental de pós-menopausa utilizando ratas ovariectomizadas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Avaliação da toxicidade sistêmica: ganho de peso, hemograma completo e bioquímicas sérica e urinária;
- ▶ Imunotoxicidade: anatomopatologia de órgãos linfoides e suas celularidades; imunofenotipagem e atividade proliferativa de linfócitos; estudo da atividade de neutrófilos e macrófagos; e avaliação da resposta de hipersensibilidade tardia;
- ▶ Avaliação do estresse oxidativo hepático.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais utilizados e a metodologia empregada para a avaliação dos diferentes parâmetros propostos na seção objetivos.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas com 60 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP. Os animais foram alojados em caixas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20 cm forradas com maravalha esterilizada, as quais foram mantidas em salas com aeração, exaustão, temperatura e umidade ambiente constantes (21-24°C e 65-70%, respectivamente) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central, em um ciclo claro/escuro de 12h e com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ/USP e estão protocolados sob o nº2739/2012.

4.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- 2-vinilpiridina (Merck) – utilizada para derivatização da glutatona reduzida na determinação dos parâmetros oxidantes.
- Acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma) – utilizado para induzir *burst* oxidativo.
- Ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (Merck) – anticoagulante utilizado para coleta de sangue.
- Adjuvante completo de Freund (Sigma) – utilizado na técnica de hipersensibilidade tardia.

- Analisador sanguíneo ABC Vet® (Horiba).
- Azul de Tripan 4% (Gibco) – utilizado para exclusão das células inviáveis na contagem celular.
- Carboxifluoresceína succinimidyl éster (CFSE) (Sigma) – utilizado para marcação de linfócitos no estudo de proliferação.
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf®).
- Cetamina (Vetbrands®) – anestésico utilizado em associação com a xilazina para anestesiá-los os ratos.
- Citometro de Fluxo FACSCalibur (Becton Dickison Immunocytometry System).
- Concanavalina A (ConA) (Merck) – mitógeno para linfócitos T
- *Dichlorofluorescein diacetate* (DCFH-DA) (Sigma) – utilizado para detecção do *burst* oxidativo.
- Espectrofotômetro (Biotek).
- Freezer -20°C.
- Glutathione redutase (Fragon) - converte toda glutathione em glutathione reduzida.
- Iodo-povidine – utilizado na assepsia pré e pós-cirúrgica.
- *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH) - antígeno de sensibilização utilizado na técnica de hipersensibilidade tardia.
- Lâminas e lamínulas (Glasstechnica).
- Lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma) – mitógeno para linfócitos B.
- Microscópio de luz modelo Nikon.
- Neomicina + bacitracina (Nebacetin®) – antibiótico tópico utilizado no pós-cirúrgico.
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH) (Merck) – utilizado como doador de elétrons nas reações de estresse oxidativo.
- Paracetamol (Medley) – utilizado para analgesia pós-cirúrgica.
- Paraformaldeído (Sinth®) – utilizado para fixar células e tecidos.
- Penicilina e estreptomicina (Cultlab) – antibióticos para meio de cultura celular.
- Placas de 6 e de 96 poços com fundo chato e fundo em U (Costar).
- Reagente de Ellman's (DTNB) (Merck®) – utilizado para quantificação de proteínas.
- RPMI-1640 (Gibco) – Meio de cultura celular.
- Seringas descartáveis de 1,0; 3,0; 5,0 e 10 mL (Rynco®).

- *Software* Cell Quest Pro® (Becton Dickison Immunocytometry System).
- *Software* FlowJo ® (Tree Star Inc).
- Tiras para urinálise (Labtest).
- Xilazina (Vetbrands®) – sedativo de uso veterinário utilizado em associação com cetamina para anestesiá-los os ratos.

As especificações dos anticorpos utilizados são descritas no quadro 1.

Quadro 1 – Anticorpos

Alvo	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
Anti-CD3	1F4	Ms IgM κ , rato	FITC	BD Pharmingen TM
Anti-CD4	OX35	Ms IgG _{2a} κ	PE	BD Pharmingen TM
Anti-CD8	OX8	Ms IgG ₁ κ	FITC	BD Pharmingen TM
Anti-CD45R	HIS24	Ms IgG _{2b} κ	FITC	BD Pharmingen TM
Anti-IgM	HIS40	Ms IgG ₁ κ	PE	BD Pharmingen TM
Anti-CD32 (Fc γ II)	D34-485	Ms IgG ₁ κ	-----	BD Pharmingen TM

4.3 AS ISOs

O extrato contendo uma mistura das principais ISOs da soja (genisteína (9%), daidzeína (34%) e glicetina (1,3%)) foi adquirido da empresa Shaanxi Jiame Phytochem Co.Ltd (Xi'an, China).

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Ovariectomia

A técnica empregada, descrita por Steele e Bennett (2011), consiste em anestesiá-la rata, monitorando a função respiratória para evitar depressão acentuada, até que ela tenha perdido os reflexos dolorosos da ponta da cauda e de pressão na pata anterior. Em seguida o animal foi colocado na plataforma cirúrgica (coberta com uma camada de filme transparente e higienizada com álcool 70%), em decúbito lateral e foi realizada a tricotomia na região dorso-lateral, entre o rebordo costal inferior e a coxa, fazendo assepsia desta região com iodo-povidine. Fez-se uma incisão de aproximadamente dois centímetros na pele e tecido celular subcutâneo a cerca de quatro centímetros lateralmente à linha mediana. A seguir, fez-se uma incisão na parede muscular até ter acesso a cavidade abdominal, localizando o ovário em meio a uma massa gordurosa. A retirada do ovário foi realizada após ligadura da extremidade do corno uterino, seccionando entre a ligadura e o ovário. Após esse procedimento, o útero foi recolocado na cavidade abdominal, suturando a parede muscular e, em seguida, a pele. O procedimento foi repetido do outro lado, para retirada do segundo ovário. Encerrada a retirada do segundo ovário, a assepsia foi repetida e uma camada de Nebacetin® foi aplicada sobre os pontos. A rata foi então colocada em uma caixa moradia limpa e coberta com folhas de papel toalha, levemente aquecidas, para se evitar a hipotermia pós-cirúrgica. Os animais foram mantidos com uma mistura de água e paracetamol (20 gotas para cada 100 mL de água filtrada – 2,6mg/mL) por três dias e ração *ad libitum*. Os animais foram acompanhados diariamente quanto a cicatrização da pele e recuperação pós-cirúrgica.

Com objetivo de minimizar o estresse pós-operatório e também para redução do estrógeno circulante, apenas após vinte dias do procedimento cirúrgico iniciou-se o tratamento com as ISOs da soja.

4.4.2 Administração das ISOs

As doses de ISOs foram obtidas por meio da diluição do extrato seco com água potável, as quais foram mantidas congeladas (-20°C) até o momento do uso. A administração das doses de ISOs às ratas foi realizada por via oral, especificamente por *gavage*, nas doses de 100; 300 e 900 mg/kg, durante 28 dias.

4.4.3 Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratas

As ratas foram pesadas e então, mantidas uma por caixa antes do início dos tratamentos para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. O consumo de ração, bem como o peso dos animais, foi mensurado a cada três dias durante todo o período experimental.

4.4.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Para a coleta de sangue, os ratos foram anestesiados com xilazina e cetamina (5,0 e 50 mg/kg, respectivamente por via intramuscular) e foram submetidos à cirurgia para exposição da veia cava caudal e coleta de sangue com anticoagulante EDTA, para avaliação do hemograma completo. Quando esta via não foi possível utilizou-se a via intracardiaca. O hemograma foi realizado por meio de um sistema automatizado (aparelho ABC Vet da Horiba).

4.4.5 Análise bioquímica

As amostras de sangue sem anticoagulante foram mantidas em temperatura ambiente por 30 min para a retração do coágulo e, posteriormente, submetidos a

centrifugação (4000 rpm, 10 minutos) para coleta do soro, o qual foi mantido em microtubos e imediatamente congelados a -20°C, para então serem submetidos às diferentes determinações bioquímicas.

As avaliações dos níveis séricos de aspartato transaminase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina, albumina, proteína total, glicose, colesterol, triglicérides, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foram realizadas por meio da utilização de Kit comercial da Laborlab em equipamento da CELM – SBA 200, o qual tem como princípio o teste UV otimizado de acordo com a IFCC (Federação Internacional de Química Clínica). A metodologia empregada para determinação dos níveis das substâncias citadas acima estão de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante.

4.4.6 Análise da urina

Para derterminação dos parâmetros urinários os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5,0 e 50 mg/kg, respectivamente por via intramuscular) e foram submetidos à cirurgia para exposição da bexiga e, em seguida, uma alíquota de aproximadamente 1 mL de urina foi coletada com o auxílio de agulha e seringa e então, transferida para tubos plásticos. Os parâmetros bilirubina, urobilinogênio, cetona, ácido ascórbico, glicose, proteína, sangue, pH, nitrito, leucócitos e densidade foram determinados por meio da utilização de tira reagente para exame de urina Uriquest® da Labtest.

4.4.7 Histopatologia

No final de cada delineamento experimental, procedeu-se a coleta de fragmentos representativos de diferentes órgãos tais como: baço, fígado, rins, timo e sistema nervoso central (SNC) que foram conservados em formol a 10%, e corados

pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para observação em microscópio ótico de luz.

4.4.8 Órgãos linfóides

Após a coleta e pesagem do timo e do baço, este último órgão linfóide foi divulsionado entre duas lâminas e lavado com 10 mL de solução gelada de RPMI-1640 com pH 7,4. As células foram acondicionadas em gelo até o momento da contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram mensuradas utilizando-se o corante azul de tripan diluído 6x em PBS. O timo destinado à avaliação histopatológica foi pesado e posteriormente foi acondicionado em frasco previamente identificado contendo formol, para posterior análise morfométrica. Aqueles timos que seriam destinados ao isolamento de timócitos para fenotipagem linfocítica foram divulsionados de maneira semelhante àquela realizada com o baço dos animais.

4.4.9 Avaliação global de células da medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral de cada animal, após a lavagem da mesma com 10 mL de solução gelada de RPMI ajustada para o pH 7,4. As células foram acondicionadas em tubos de poliestireno e dispersas com auxílio de pipeta tipo “Pasteur” até obter-se uma suspensão celular homogênea. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de tripan, diluído 6x em PBS.

4.4.10 Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais residentes por meio do *burst* oxidativo e da fagocitose

Após os animais serem submetidos a eutanásia, foram injetados cerca de 10 mL de PBS a 4°C na cavidade peritoneal de cada animal e, após massagem abdominal, foi colhida uma suspensão de células, através de punção da cavidade peritoneal. Estas células foram mantidas em banho de gelo, dentro de tubos de ensaio de plástico de polipropileno até serem quantificadas em câmara de Neubauer. As suspensões de células conservadas em banho de gelo foram ajustadas para cerca de $2,0 \times 10^6$ células/mL.

Após o ajuste das células, os tubos (cinco por amostra) para a citometria de fluxo foram preparados da seguinte maneira:

Tubo 1: $2,0 \times 10^5$ células em 1 mL de PBS

Tubo 2: 100 µL da amostra, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM) em 800 µL de PBS.

O DCFH-DA é hidrolisado a DCFH nas células e então, é oxidado a DCF por várias espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células e emite fluorescência verde.

Tubo 3: 100 µL da amostra, 100 µL de *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI) em 900 µL de PBS. O iodeto de propídeo intercalado ao DNA bacteriano emite fluorescência vermelha.

Tubo 4: 100 µL da amostra, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM), 100 µL de SAPI em 700 µL de PBS.

Tubo 5: 100 µL da amostra, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM), 100 µL de PMA (1 ng/µL) em 700 µL de PBS.

O PMA e o SAPI foram utilizados como estímulos *in vitro* para produção de espécies reativas de oxigênio. O tubo contendo apenas SAPI foi utilizado para avaliação da fagocitose. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30min, logo após adicionou-se 2mL de EDTA (3 mM) para parar a reação. As amostras foram então centrifugadas 1500 rpm por 5 min e ressuspensas em 300 µL de PBS. Em seguida fez-se a análise por citometria de fluxo.

Cada amostra foi passada no citômetro de fluxo sendo adquiridos 10.000 eventos. Os valores referentes ao *burst* oxidativo e a fagocitose foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos macrófagos

peritoneais. Este valor é dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população. Os dados foram analisados através do programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, USA).

4.4.11 Avaliação da atividade de neutrófilos circulantes por meio do *burst* oxidativo e da fagocitose

Foi utilizado o método proposto por Hasui et al. (2004) com modificações. No final do período experimental, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5,0 e 50 mg/kg, respectivamente por via intramuscular) seguindo-se a coleta de sangue heparinizado. Os tubos (cinco por amostra) para citometria de fluxo foram preparados da seguinte maneira:

Tubo 1: 100 µL de sangue em 1 mL de PBS

Tubo 2: 100 µL de sangue, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM) em 800 µL de PBS.

O DCFH-DA é hidrolisado a DCFH nas células e então, é oxidado a DCF por várias espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células e emite fluorescência verde.

Tubo 3: 100 µL de sangue, 100 µL de *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI) em 900µL de PBS. O iodeto de propídeo intercalado ao DNA bacteriano emite fluorescência vermelha.

Tubo 4: 100 µL de sangue, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM), 100 µL de SAPI em 700 µL de PBS.

Tubo 5: 100 µL de sangue, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM), 100 µL de PMA (1 ng/µL) em 700 µL de PBS.

O PMA e o SAPI foram utilizados como estímulos *in vitro* para produção de espécies reativas de oxigênio. O tubo contendo apenas SAPI foi utilizado para avaliação da fagocitose. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30min, logo após adicionou-se 2mL de EDTA (3 mM) para parar a reação. As amostras foram então centrifugadas 1500 rpm por 5 min e ressuspensas em 2 mL de cloreto de sódio 0,2%. Após 20 segundos, foram adicionados 2 mL de cloreto de sódio 1,6% e as amostras foram centrifugadas novamente. Este processo foi repetido mais uma vez

para lise completa dos eritrócitos. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS. Em seguida fez-se a análise por citometria de fluxo.

Cada amostra foi passada no citômetro de fluxo sendo adquiridos 10.000 eventos. Os valores referentes ao *burst* oxidativo e a fagocitose foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos. Este valor é dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população. Os dados foram analisados através do programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, USA).

4.4.12 Fenotipagem de subpopulações linfocíticas

Para a determinação das subpopulações de linfócitos foi realizada análise por citometria de fluxo, em que as células foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Foward Scatter* e SSC – *Side Scatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências do isotiocianato de fluoresceína (FITC), do CFSE e do DCFH-DA foram detectadas pelo filtro FL-1 (530 nm), da ficoeritrina (PE) foi detectada pelo filtro FL-2 (585 nm) e da peridinin chlorophyll protein - cyanine dye 5.5 (PerCP-Cy5.5), da ficoeritrina – cyanine dye 7 (PE-Cy7) e do PI foram detectadas pelo filtro FL-3 (> 650 nm).

Todos os dados foram analisados através do *software* FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, USA), sendo as populações de interesse em cada experimento selecionadas por meio de *gates*, excluindo assim outros tipos celulares das amostras. Além disto, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

As células linfóides foram obtidas de fragmentos de baço e timo, os quais foram acondicionados em microtubos de 2 mL, contendo 1 mL de RPMI. Após duas lavagens com RPMI, baço e timo foram divulsionados com 5 mL de RPMI, até obter uma suspensão de células. A suspensão de células esplênicas foi centrifugada a 1200 rpm/8 min e ressuspensa em 10 mL de solução de lise (cloreto de amônio). Cerca de dois minutos após, as amostras foram novamente centrifugadas. Este processo foi repetido mais uma vez para completa lise dos eritrócitos. Em seguida, tanto timócitos quanto esplenócitos foram ressuspensas em 5 mL de RPMI, contadas e ajustadas

para 1×10^6 cels/100 μ L em microtubos de 1,5 ml, para marcação das moléculas de superfície. Também foi coletado o sangue dos animais para análise de linfócitos circulantes, 100 μ L de sangue de cada animal foram lisados com 2,0 mL de solução salina 0,2% durante 20 segundos e depois adicionados 2,0 mL de solução salina 1,6% para estabilizar o meio, o procedimento foi repetido até a completa lise dos eritrócitos, após isso as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 μ L de PBS para marcação das moléculas de superfície.

A caracterização das moléculas de superfície dos linfócitos T foi realizada com o uso de anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 e os anticorpos anti-CD45 e anti-IgM para os linfócitos B. Para impedir marcações inespecíficas todas as células foram inicialmente incubadas com anticorpos anti-CD32 (receptor Fc γ II).

Uma alíquota de 100 μ L da suspensão de esplenócitos, timócitos, ou células do sangue (10^6 céls/mL) foram acondicionadas em tubos para citometria e incubadas com os diferentes anticorpos marcados, durante 30 minutos, no escuro, à temperatura de 4°C. Após este período, as células foram lavadas para eliminar os anticorpos não ligados e ressuspensas em 300 μ L de PBS para então serem analisadas por meio de citometria de fluxo.

4.4.13 Avaliação da atividade proliferativa de linfócitos

Cada baço foi coletado e macerado em 5 mL de RPMI-1640 estéril formando uma suspensão de células. Esta suspensão foi centrifugada a 1200 rpm/ 8 min e ressuspensa em 4 mL de cloreto de amônio estéril para a lise das hemácias, sendo centrifugado novamente em seguida. Este procedimento foi repetido mais uma vez para a completa lise das hemácias. Após esta etapa as células foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI completo (10% de soro fetal bovino) estéril e cultivadas em placas de 96 poços em estufa para cultura de células a 37°C e 5% de CO₂ por duas horas. Esta etapa serve para que os monócitos fiquem aderidos às placas e apenas os linfócitos fiquem em suspensão.

Depois deste período de incubação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos falcon de 15 mL e contado, sendo ajustado para alíquota de 1 mL com 1×10^7 células em meio RPMI incompleto e incubado no escuro com 1 μ L de

solução de CFSE (solução mãe 5mM em DMSO). Após 20 minutos, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 mL de meio RPMI completo estéril e contadas novamente. Ajustou-se o número de células para 2×10^6 células/mL e colocou-se 100 μ L desta suspensão em placas de 96 poços de fundo em U, da seguinte maneira: 3 poços sem estímulo, 3 poços com 20 μ L de ConA (100 μ g/mL mitógeno para linfócitos T) e 3 poços com 10 μ L/ poço de LPS (300 μ g/mL, mitógeno para linfócitos B) mais 10 μ L de meio completo, assim todas as amostras ficaram com o mesmo volume. Depois de plaqueadas todas as amostras, as placas foram mantidas em estufa para cultura de células a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas. Após este período, cada amostra em triplicata foi reunida em um mesmo tubo, centrifugada a 1200 rpm/ 8 min e ressuspensas em 200 μ L de PBS para avaliação por citometria de fluxo.

Para o cálculo da porcentagem de proliferação foi utilizado o método proposto por Lyons (2000), no qual propõe que a porcentagem de eventos em um pico de proliferação (P_n) deve ser dividida por 2^n , para calcular a porcentagem original das células que deram origem a estas. Este número é chamado de células não divididas (CND) e a soma destes é o total de células não divididas (TND). A soma das CND dos picos subsequentes ao primeiro é o total de células precursoras que proliferaram durante os dias de incubação, sendo chamadas (PRE). A porcentagem de proliferação é então, obtida por $PRE/TND \times 100$. Por exemplo: há 5 picos de proliferação de P0 a P4, então o $TND = P0 + (P1/2) + (P2/4) + (P3/8) + (P4/16)$, o $PRE = (P1/2) + (P2/4) + (P3/8) + (P4/16)$ e a % de proliferação = $PRE/TND \times 100$.

$$\% \text{ proliferação} = \frac{PRE}{TND} \times 100 = \frac{\sum P_n - P_0}{\sum \frac{P_n}{2^n}} \times 100$$

PRE= células precursoras que proliferam

TND= total de células não divididas

P= pico de proliferação

n= número de pico de proliferação

4.4.14 Avaliação da resposta imune celular por meio da reação de hipersensibilidade do tipo tardia – *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH)

Para a sensibilização imunológica dos ratos, foi injetado por via subcutânea, na base da cauda de cada animal, 0,1 mL de KLH em (1,0 mg/mL PBS) emulsificado em Adjuvante completo de Freud na razão de 1:1.

Sete dias após a sensibilização, preparou-se o *heat-aggregated* KLH, aquecendo-se o mesmo (10 mg/mL em salina) por 1 hora em banho-maria a 75°C. Esta solução foi centrifugada a 2000 rpm, por 10 minutos, para remover o excesso de salina; a seguir foi injetada (0,1 mL/por animal) no coxim plantar direito dos animais.

Após 24 horas de desafio, o edema resultante foi mensurado. A avaliação da resposta imune celular (DTH) foi expressa a partir da subtração do valor obtido na mensuração do coxim plantar da pata direita 24 horas depois do desafio com aquele valor da mensuração antes do inóculo.

4.4.15 Parâmetros pró- e antioxidantes hepáticos

Após a eutanásia, procedeu-se a abertura da cavidade abdominal dos animais imediatamente e, então, foi realizada a perfusão do fígado *in situ* com solução salina 0,9% gelada, sendo o mesmo em seguida, removido do animal.

O fígado perfundido foi pesado, um pequeno fragmento foi removido para determinação dos níveis hepáticos de glutathiona. O restante do órgão foi colocado em recipientes contendo solução de KCL 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0, picado e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução de KCL 140 mM fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 p/v). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após a centrifugação a 900 *g*/20 minutos a 4°C foi utilizado para determinação do potencial peroxidativo.

4.4.15.1 Parâmetros pró-oxidantes: potencial peroxidativo

O potencial peroxidativo, dado pela medida colorimétrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) produzidas ao fim de um determinado período de incubação (neste caso, 2 horas) foi utilizado para avaliar a potenciação do estresse oxidativo hepático.

Uma alíquota de 3 mL de homogeneizado hepático foi incubada em 7 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 a 37°C, sob agitação constante. Amostras do tempo zero e após duas horas foram retiradas e precipitadas com TCA 5%. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi submetido a reação com ácido tiobarbitúrico 0,67% em banho-maria, por 20 minutos. Após resfriamento em gelo por 20 minutos, foi registrada a absorbância em 535 nm (BERNHEIM et al, 1948). A concentração de SRAT foi calculada considerando o coeficiente de extinção micromolar $\epsilon = 0,156 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Os valores do potencial peroxidativo hepático foram expressos em ηmoles de SRAT produzidos por mg de proteína em 120 minutos.

4.4.15.2 Parâmetros antioxidantes: determinação dos níveis de glutathiona total (GSHT), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

Fragmentos de 0,1g de tecido hepático foram homogeneizados em uma mistura gelada de ácido metafosfórico 5% e ácido sulfosalicílico 0,6% em seguida o homogeneizado foi submetido a centrifugação a 3000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e mantido no gelo até a determinação (no máximo 1 hora).

Para a determinação da forma GSSG, primeiramente foi feito a derivatização da forma GSHT com 2-vinilpiridina. O extrato ácido obtido acima (100 μL) foi adicionado a um tubo de plástico, na presença de 2 μL de 2-vinilpiridina. Após 1 hora em temperatura ambiente, foram adicionados 6 μL de trietanolamina para neutralização do pH (entre 6,0 e 7,0).

As amostras neutralizadas com e sem 2-vinilpiridina foram centrifugadas a 15.600 g por 2 minutos, e uma alíquota de 20 μL foi adicionada a uma cubeta contendo

980 μ L de tampão fosfato de potássio 0,1 M com EDTA 0,001 M, NADPH 240 μ M, DTNB 76 μ M e 0,12 U/mL de glutathiona redutase, que converte toda glutathiona presente na amostra em GSH (TIETZE, 1969).

O ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) reage com a GSH formando o cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). A variação de absorbância foi medida a 412 nm, a 25°C, por 4 minutos. Os resultados foram calculados utilizando 50 μ L de GSSG 10 μ M como padrão e expressos em η moles de glutathiona /g de tecido.

4.4.16 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett para comparação dos grupos experimentais com o grupo controle. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises que apresentaram nível de significância de $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão e os dados de porcentagem estão expressos como mediana (mínimo – máximo).

A thick dark blue vertical bar is positioned on the left side of the page. To its right, several thin, curved lines in shades of blue and grey sweep upwards and outwards, creating a dynamic, abstract graphic element.

Delineamento experimental e resultados

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os experimentos realizados e os resultados obtidos.

5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE PESO, BEM COMO DE ÓRGÃOS LINFOIDES E SUAS CELULARIDADES DE RATAS ADULTAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 40 ratas adultas ovariectomizadas as quais foram separadas em quatro grupos: um controle (Co) e 3 experimentais (n=10/grupo) que receberam, por gavagem, durante 28 dias as doses de 100, 300 e 900mg/kg de ISOs. Os animais do grupo controle receberam apenas água de bebida pela mesma via e período, conforme descrito no item 4.4.2. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses e também do consumo de ração (item 4.4.3). No último dia de experimentação (29º dia), todos os animais foram pesados e então submetidos à eutanásia por meio da decapitação, para coleta dos diferentes órgãos linfoides para a avaliação do peso relativo e celularidade dos mesmos, bem como realização da coleta de fragmentos significativos para avaliação histológica conforme descrito detalhadamente nos itens 4.4.7; 4.4.8 e 4.4.9.

5.1.1 Resultados

A tabela 1 mostra e a figura 4 ilustra o consumo médio de ração de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não com diferentes doses de ISOs durante 28 dias. A ANOVA revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais ($F= 6,50$; $df= 3,35$ com $p<0,01$). O teste *post hoc* revelou haver diminuição

estatisticamente significativa no consumo de ração ($p < 0,01$ Co vs 300 e 900mg/kg Dunnett *post-test*) dos animais que receberam as maiores doses de ISOs.

Tabela 1 - Consumo médio de ração (em gramas), de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Consumo médio de ração (gramas)				
Doses de ISOs (em mg/kg)				
Co ^a	100 ^b	300 ^b	900 ^b	
67,40 ± 6,80	63,20 ± 3,70	58,50 ± 4,80**	57,00 ± 6,90**	

^an=9 animais/grupo; ^bn=10 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

** $p < 0,01$ versus grupo controle; Teste de Dunnett.

Figura 4 – Consumo médio de ração (em gramas) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não com diferentes doses de ISOs durante 28 dias, por gavagem

Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão. ** $p < 0,01$, Teste de Dunnett.

Em relação ao ganho de peso, a ANOVA revelou haver alterações significantes entre os grupos de animais ($F = 17,34$; $df = 3,35$ com $p < 0,001$). De fato, o teste *post hoc* de escolha revelou que ratas tratadas com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs apresentaram diminuição estatisticamente significativa no ganho de peso ($p < 0,001$ Co vs 100, 300 e 900mg/kg Dunnett *post-test*) conforme mostra a tabela 2.

Já em relação à variação de peso das ratas ao longo do tratamento, a análise pela ANOVA de duas vias evidenciou que a duração do tratamento não influenciou este parâmetro, porém houve diminuição significativa do ganho de peso com o aumento das doses de ISOs ($p < 0,001$ doses; $p = 0,8747$ tempo; ANOVA de duas vias) a partir do 4º dia de tratamento ($p < 0,05$ Co vs 300; $p < 0,01$ Co vs 900; pós-teste Bonferroni), conforme ilustra a figura 5.

Tabela 2 - Ganho de peso total (em gramas), de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Ganho de peso (gramas)				
Doses de ISOs (mg/kg)				
Co ^a	100 ^b	300 ^b	900 ^b	
25,90 ± 11,00	0,90 ± 11,90***	-3,80 ± 10,40***	-11,80 ± 13,20***	

^an=9 animais/grupo; ^bn=10 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

*** $p < 0,001$ versus grupo controle; Teste de Dunnett.

Figura 5 – Variação do peso (em gramas) de ratas adultas ovariectomizadas, tratadas ou não com diferentes doses de ISOs por gavagem, durante os 28 dias

Os dados são apresentados como média de cada grupo em cada dia da avaliação. ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$ versus grupo controle

Em relação ao peso de órgãos linfoides, o teste estatístico empregado (ANOVA) revelou haver diferenças estatisticamente significantes no peso relativo do baço de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não com ISOs ($F= 4,42$; $df= 3,35$ $p<0,05$). O teste *post hoc* revelou haver aumento do peso relativo do baço de animais que receberam 100, 300 e 900mg/kg de ISOs ($p<0,05$ Co vs 100mg/kg; $p<0,01$ Co vs 300mg/kg; $p<0,05$ Co vs 900mg/kg Dunnett *post-test*) Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada quanto ao peso absoluto deste órgão (Tabela 3 e Figura 6).

Tabela 3 – Pesos absoluto (g) e relativo do baço (g/100g de p.v.) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

	Peso do baço			
	Doses de ISOs (em mg/kg)			
	Co ^a	100 ^b	300 ^b	900 ^b
Peso absoluto (g)	0,70 ± 0,05	0,80 ± 0,20	0,80 ± 0,10	0,70 ± 0,10
Peso relativo (g/100g de p.v)	0,20 ± 0,03	0,30 ± 0,05*	0,30 ± 0,05**	0,30 ± 0,03*

^an=9 animais/grupo; ^bn=10 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$ *versus* grupo controle; teste de Dunnett.

Figura 6 - Pesos absoluto (g) e relativo do baço (g/100g de p.v.) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Quanto ao peso relativo do timo, a ANOVA revelou não haver diferenças estatisticamente significantes neste parâmetro entre os grupos de animais, entretanto, este mesmo teste estatístico evidenciou alterações significantes no peso absoluto deste órgão linfóide nos diferentes grupos de animais ($F= 4,92$; $df= 3,35$ com $p<0,01$). O teste *post hoc* revelou haver diminuição estatisticamente significativa no peso úmido do timo ($p<0,05$ Co vs 300mg/kg; $p<0,01$ Co vs 900mg/kg Dunnett post-test) (Tabela 4 e Figura 7).

Tabela 4 - Pesos absoluto (g) e relativo do timo (g/100g de peso vivo) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

	Peso do timo			
	Doses de ISOs (em mg/kg)			
	Co ^a	100 ^b	300 ^b	900 ^b
Peso absoluto (g)	0,42 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,34 ± 0,05**	0,36 ± 0,05*
Peso relativo (g/100g de p.v.)	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02

^an=9 animais/grupo; ^bn=10 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

* p<0,05; ** p<0,01 *versus* grupo controle; teste de Dunnett.

Figura 7 – Pesos absoluto (g) e relativo do timo (g/100g de peso vivo) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. * p<0,05; ** p<0,01 *versus* grupo controle; teste de Dunnett

Por fim, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada nas celularidades do baço (Tabela 5 e Figura 8), da medula óssea (Tabela 6 e Figura 9). Não foram observados também, alterações histológicas significativas em nenhum dos órgãos linfoides avaliados.

Tabela 5 - Celularidade do baço (esplenócitos x 10^7 /g de baço) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Celularidade do baço (esplenócitos x 10^7 /g de baço)			
Doses de ISOs (em mg/kg)			
Co ^a	100 ^b	300 ^b	900 ^b
12,50 ± 5,60	15,10 ± 6,90	15,10 ± 5,60	13,00 ± 7,50

^an=9 animais/grupo; ^bn=10 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

Figura 8 - Celularidade do baço de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

Tabela 6 - Celularidade de medula óssea (células x 10^7) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Celularidade de medula óssea (células x 10^7)			
Doses de ISOs (em mg/kg)			
Co ^a	100 ^b	300 ^b	900 ^b
0,81 ± 0,41	0,76 ± 0,25	0,60 ± 0,23	0,79 ± 0,33

^an=9 animais/grupo; ^bn=10 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

Figura 9 - Celularidade de medula óssea de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, DA BIOQUÍMICA SÉRICA, DA URINA E HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO E RINS DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 40 ratas as quais foram separadas em quatro grupos: um controle e 3 experimentais (n=10/grupo) que receberam, por gavagem, durante 28 dias as doses de 100, 300 e 900mg/kg de ISOs. Os animais do grupo controle receberam apenas água de bebida pela mesma via e período. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses e também do consumo de ração (item 4.4.3). No último dia de experimentação (29º dia), todos os animais foram pesados e então submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico, para coleta de sangue total e então, realização do hemograma e bioquímica sérica, da urina para determinação dos parâmetros urinalíticos, bem como, a coleta de fragmentos significativos do fígado e rim para avaliação histológica conforme descrito detalhadamente nos itens 4.4.4; 4.4.5; 4.4.6 e 4.4.7.

5.2.1 Resultados

O teste matemático empregado (ANOVA) na avaliação do hemograma completo de ratas adultas revelou não haver diferenças significantes entre os grupos de animais que receberam ou não as diferentes doses de ISOs por gavagem, durante 28 dias (Tabela 7).

Da mesma forma, nenhum grupo apresentou alterações morfológicas dignas de nota no fígado ou no rim dos animais.

Tabela 7 – Hemograma completo de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Parâmetros Hematológicos								
Doses (mg/kg)	Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	Plaquetas (10 ⁶ /mm ³)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VCM (μ ³)	HCM (pg)	CHCM (%)
Co ^a	7,90 ± 1,50	6,60 ± 0,30	591,00 ± 50,10	14,50 ± 1,00	36,30 ± 2,20	54,50 ± 1,40	21,90 ± 0,80	39,90 ± 1,10
100 ^b	7,70 ± 1,50	6,50 ± 0,20	601,20 ± 57,10	14,20 ± 0,50	35,50 ± 1,10	54,22 ± 1,30	21,70 ± 0,50	40,00 ± 0,50
300 ^b	7,60 ± 2,40	6,60 ± 0,30	640,30 ± 101,60	14,20 ± 0,90	35,90 ± 1,30	54,00 ± 1,50	21,70 ± 0,70	40,00 ± 0,50
900 ^b	6,50 ± 1,00	6,70 ± 0,40	623,30 ± 89,40	14,20 ± 0,80	35,70 ± 1,80	53,00 ± 0,90	21,00 ± 0,30	39,70 ± 0,90

^an= 10 animais/grupo; ^bn=9 animais/grupo. HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

Já em relação aos parâmetros bioquímicos, a tabela 8 mostra e a figura 10 ilustra os resultados de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não com diferentes doses de ISOs. O teste *post hoc* revelou haver diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de ureia em ratas tratadas com 900mg/kg de ISOs ($F= 7,36$ $df= 3,27$ $p<0,001$). O mesmo teste mostrou aumento estatisticamente significativo nas concentrações de glicose ($F= 2,61$ $df= 3,27$ $p<0,05$) bem como diminuição dos níveis séricos de HDL ($F= 3,30$ $df= 3,27$ $p<0,05$).

Tabela 8 - Bioquímica sérica de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavage, durante 28 dias

	Doses de ISOs (mg/kg)		
	Bioquímica sérica		
	Co ^a	100 ^b	300 ^b 900 ^b
AST (U/L)	156,00 ± 47,70	141,30 ± 19,20	133,30 ± 18,90 139,30 ± 23,20
ALT (U/L)	71,00 ± 18,40	59,60 ± 9,30	61,80 ± 10,60 67,80 ± 12,70
ALP (U/L)	186,00 ± 24,00	144,00 ± 53,30	165,40 ± 15,00 158,40 ± 12,00
Uréia (mg/dL)	58,40 ± 6,00	54,00 ± 6,90	54,00 ± 8,20 39,00 ± 12,00***
Creatinina (mg/dL)	0,80 ± 0,10	0,90 ± 0,10	0,90 ± 0,010 0,80 ± 0,10
Albumina (g/dL)	2,90 ± 0,10	2,80 ± 0,20	2,80 ± 0,10 2,90 ± 0,10
Proteína total (g/dL)	5,70 ± 0,30	5,30 ± 0,40	5,30 ± 0,40 5,40 ± 0,40
Glicose (mg/dL)	131,00 ± 37,00	172,00 ± 48,00	175,50 ± 41,00 182,00 ± 21,00*
Colesterol (mg/dL)	105,00 ± 5,70	100,00 ± 23,00	100,00 ± 22,00 93,00 ± 23,70
Triglicérides (mg/dL)	91,70 ± 19,80	95,10 ± 43,80	103,00 ± 61,90 96,00 ± 29,50
HDL (mg/dL)	91,00 ± 12,00	81,30 ± 18,00	72,90 ± 19,70 63,80 ± 18,80*
VLDL (mg/dL)	18,30 ± 4,00	19,00 ± 8,80	20,60 ± 12,40 18,30 ± 5,90

^an=7 animais/grupo; ^bn=8 animais/grupo. AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; ALP= fosfatase alcalina; HDL = lipoproteína de alta densidade; VLDL= lipoproteína de muita baixa densidade. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão * p<0,05; *** p<0,001 versus grupo controle; teste de Dunnett.

Figura 10 - Bioquímica sérica de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com diferentes doses de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão * $p<0,05$; *** $p<0,001$ *versus* grupo controle; teste de Dunnett. AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; ALP= fosfatase alcalina; HDL = lipoproteína de alta densidade; VLDL= lipoproteína de baixa densidade

A tabela 9 mostra os dados referentes ao exame de urina de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não com diferentes doses de ISOs. O teste estatístico empregado não revelou diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 9 - Análise dos parâmetros urinários de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Parâmetros urinários				
	Doses de ISOs (em mg/kg)			
	Co ^a	100 ^a	300 ^a	900 ^b
Bilirubina	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Urobilinogênio	Normal	Normal	Normal	Normal
Cetona	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Ác. Ascórbico	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Glicose	437,50 ± 470,40	225,00 ± 133,60	150,00 ± 173,20	131,30 ± 166,80
Proteína	Traços	Traços	Traços	Traços
Sangue	82,50 ± 135,30	91,30 ± 130,20	42,50 ± 104,20	95,70 ± 140,60
pH	7,10 ± 0,80	7,00 ± 0,50	6,90 ± 0,50	6,80 ± 0,30
Nitrito	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Leucócitos	25,00 ± 23,20	9,40 ± 12,90	6,30 ± 11,60	10,70 ± 13,40
Densidade	1004,00 ± 1,70	1004,00 ± 1,70	1006,00 ± 1,70	1005,00 ± 0,00

^an=8 animais/grupo; ^bn=7 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO DE RATAS ADULTAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 32 ratas as quais foram separadas em quatro grupos: um controle e 3 experimentais (n=8/grupo) que receberam, por gavagem, durante 28 dias as doses de 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses (item 4.4.3). Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por meio da decapitação, e o fígado foi perfundido e coletado para avaliação dos parâmetros pró e antioxidantes hepáticos conforme detalhadamente descrito nos itens 4.4.15; 4.4.15.1 e 4.4.15.2.

5.3.1 Resultados

A tabela 10 mostra e a figura 11 ilustra os dados referentes as concentrações de GSHT, GSH, GSSH e a razão entre GSH/ GSSH. O teste matemático empregado (ANOVA) revelou haver diferenças significantes entre os grupos de animais em relação aos níveis de GSSG ($F= 2,64$ $df= 3,26$ $p<0,05$) e na razão GSH/GSSG ($F= 2,14$ $df= 3,24$ $p<0,05$). O teste de Dunnett evidenciou que ratas tratadas com a maior dose de ISOs apresentaram aumento estatisticamente significante nas concentrações de GSSG ($p<0,05$ Co vs 900mg/kg), e diminuição na razão GSH/GSSG ($p<0,05$ Co vs 900mg/kg).

Tabela 10 - Concentração de glutathione total (GSHT), glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e a razão entre glutathione reduzida/oxidada (GSH/GSSG) do fígado de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Concentração de glutathione μmol/g de tecido				
Doses de ISOs (em mg/kg)				
	Co ^a	100 ^a	300 ^a	900 ^a
GSHT	11,80 ± 2,30	11,10 ± 2,70	10,10 ± 2,00	12,90 ± 2,40
GSH	11,40 ± 2,50	10,40 ± 2,70	9,60 ± 2,20	12,00 ± 2,30
GSSG	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,20	0,30 ± 0,20	0,50 ± 0,40*
GSH/GSSG	131,30 ± 137,70	74,10 ± 41,50	64,30 ± 63,80	28,80 ± 20,30*

^an=8 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. *p<0,05 *versus* grupo controle; Teste Dunnett.

Figura 11 - Concentração de glutathiona total (GSHT), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e razão entre glutathiona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) do fígado de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ versus grupo controle; Teste Dunnett.

Em relação ao potencial peroxidativo avaliado através da obtenção das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico o teste matemático empregado revelou não haver diferenças significantes entre os grupos de animais conforme mostra a tabela 11.

Tabela 11 - Potencial peroxidativo de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavage, durante 28 dias

Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nmol/mg proteína			
Doses de ISOs (em mg/kg)			
Co ^a	100 ^b	300 ^c	900 ^c
3,00 ± 1,00	3,00 ± 0,60	3,00 ± 0,70	2,80 ± 0,50

^an=6 animais/grupo; ^bn=7 animais/grupo; ^cn=8 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

5.4 EXPERIMENTO 4: FENOTIPAGEM LINFOCÍTICA: AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E T PRESENTES NO SANGUE E BAÇO DE RATAS ADULTAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 20 ratas, as quais foram separadas em quatro grupos: um controle e 3 experimentais que receberam por gavagem durante 28 dias as doses de 100, 300 e 900 mg/kg de ISOs, os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período. Durante todo o período experimental fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses (item 4.4.3). No último dia de experimentação (29º dia), todos os animais foram pesados e foram então submetidos à eutanásia por meio da decapitação, para a realização da fenotipagem linfocítica, conforme detalhadamente descrito no item 4.4.12.

5.4.1 Resultados

Na avaliação da fenotipagem de linfócitos observou-se que o tratamento com as diferentes doses de ISOs não alterou a porcentagem dos linfócitos avaliados, a saber: T (CD3⁺CD4⁺), T (CD3⁺CD8⁺) e linfócitos B (IgM⁺) do sangue periférico e nem alterou a proporção de linfócitos T (CD3⁺CD4⁺), T (CD3⁺CD8⁺) e linfócitos B do baço, conforme demonstrado nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12 - Porcentagem de linfócitos T (CD3⁺CD8⁺), T (CD3⁺CD4⁺) e B (IgM⁺) do sangue de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Fenotipagem de linfócitos no sangue				
	Doses de ISOs (mg/kg)			
	Co ^a	100 ^a	300 ^a	900 ^a
T (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	8,70 ± 1,70	7,90 ± 1,00	8,20 ± 1,50	7,20 ± 1,20
T (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	43,70 ± 10,60	49,40 ± 7,60	47,80 ± 4,60	48,60 ± 2,70
CD4/CD8	5,00 ± 0,83	6,30 ± 1,10	5,90 ± 0,70	6,90 ± 1,00*
B (IgM ⁺)	27,30 ± 17,00	24,60 ± 9,60	27,30 ± 3,50	30,20 ± 9,60

^an=5 animais/grupo Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. * p<0,05 *versus* grupo controle; teste de Dunnett.

Tabela 13 - Porcentagem de linfócitos T (CD3⁺CD8⁺), T (CD3⁺CD4⁺) e B (IgM⁺) esplênicos de ratas adultas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Fenotipagem de linfócitos esplênicos				
	Doses de ISOs (mg/kg)			
	Co ^a	100 ^a	300 ^a	900 ^a
T (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	9,90 ± 1,70	10,10 ± 1,80	10,60 ± 1,40	10,30 ± 1,40
T (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	18,20 ± 2,80	21,70 ± 3,00	21,20 ± 2,80	21,60 ± 1,70
CD4/CD8	1,87 ± 0,30	2,20 ± 0,60	2,00 ± 0,23	2,10 ± 0,30
B (IgM ⁺)	52,50 ± 2,10	52,20 ± 3,10	51,00 ± 2,90	51,60 ± 2,30

^an=5 animais/grupo Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

5.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATAS ADULTAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 32 ratas as quais foram separadas em quatro grupos: um controle e 3 experimentais (n=8/grupo) que receberam, por gavagem, durante 28 dias as doses de 100 300 e 900mg/kg de ISOs, os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses (item 4.4.3). No último dia de experimentação (29º dia), todos os animais foram pesados e então submetidos à eutanásia por meio da decapitação, os macrófagos foram coletados do peritônio para avaliação de atividade através da mensuração da fagocitose e *burst* oxidativo basal e induzido por *S. aureus* e PMA, conforme detalhadamente descrito nos itens 4.4.10.

5.5.1 Resultados

A tabela 14 mostra os dados provenientes do *burst* oxidativo e da fagocitose de macrófagos peritoneais. A aplicação do teste estatístico ANOVA revelou haver diferenças significantes em relação aos grupos de animais tratados ou não com as ISOs ($F= 8,52$ $df= 3,28$ $p<0,001$). O teste de Dunnett revelou que macrófagos oriundos de animais tratados com a maior dose tiveram diminuição estatisticamente significativa ($p<0,001$ Co vs 900mg/kg) na intensidade da fagocitose, quando comparados com os animais do grupo controle.

Tabela 14 - *Burst* oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

<i>Burst</i> oxidativo e fagocitose				
Doses de ISOs (em mg/kg)				
		Co ^a	100 ^a	300 ^a 900 ^a
Fagocitose	%	79,90 ± 6,40	79,00 ± 7,30	76,80 ± 8,40 60,30 ± 25,30
	MFI ^b	128,00 ± 14,40	125,00 ± 18,20	109,10 ± 34,90 73,00 ± 25,20**
Burst oxidativo (MFI)		575,60 ± 274,60	475,10 ± 179,70	570,40 ± 306,70 602,30 ± 435,40
Burst oxidativo induzido pela fagocitose (MFI)		383,60 ± 131,90	361,10 ± 137,50	371,50 ± 67,50 408,30 ± 114,00
Burst oxidativo induzido pelo PMA (MFI)		509,00 ± 216,60	516,60 ± 237,30	712,00 ± 429,00 650,80 ± 641,30

^an=8 animais/grupo; ^bMFI= média da intensidade de fluorescência. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. ** p<0,01 versus grupo controle; teste de Dunnett.

5.6 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DE RATAS ADULTAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 32 ratas as quais foram separadas em quatro grupos: um controle e 3 experimentais (n=8/grupo) que receberam, por gavagem, durante 28 dias as doses de 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, os animais do grupo controle receberam apenas água de bebida pela mesma via e período. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses (item 4.4.3). No último dia de experimentação (29º dia), todos os animais foram pesados e então submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico, para coleta de sangue total para avaliação da atividade de neutrófilos através da mensuração da fagocitose e *burst* oxidativo basal e induzido por *S. aureus* e PMA, conforme detalhadamente descrito no item 4.4.11.

5.6.1 Resultados

A tabela 15 mostra os valores referentes ao *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos. O teste estatístico empregado (ANOVA) revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais ($F= 3,86$ $df= 3,28$ $p<0,01$). O teste *post hoc* evidenciou que neutrófilos de ratas tratadas com a dose de 300mg/kg de ISOs apresentaram aumento da intensidade de fagocitose quando comparados com o grupo controle ($p<0,01$ Co vs 300mg/kg Dunnett *post-test*).

Tabela 15 - *Burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavage, durante 28 dias

Burst oxidativo e fagocitose					
		Doses de ISOs (mg/kg)			
		Co ^a	100 ^a	300 ^a	900 ^a
Fagocitose	%	66,80 ± 6,00	69,90 ± 5,90	63,80 ± 5,10	62,00 ± 15,30
	MFI ^b	110,40 ± 31,10	140,30 ± 43,50	174,80 ± 38,60**	152,50 ± 40,70
Burst oxidativo (MFI)		558,00 ± 124,40	585,80 ± 311,50	635,80 ± 476,00	396,90 ± 75,20
Burst oxidativo induzido pela fagocitose (MFI)		1662,00 ± 619,50	1316,00 ± 566,70	1245,00 ± 302,60	1072,00 ± 344,10
Burst oxidativo induzido pelo PMA (MFI)		2774,00 ± 651,30	2977,00 ± 622,60	2691,00 ± 498,70	2178,00 ± 546,40

^an=8 animais/grupo; ^b MFI= média da intensidade de fluorescência. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão ** p<0,01 versus grupo controle; teste de Dunnett.

5.7 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (*DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY*- DTH) DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 40 ratas as quais foram separadas em quatro grupos: um controle e 3 experimentais (n=10/grupo) que receberam, por gavagem, durante 28 dias as doses de 100 300 e 900mg/kg de ISOs, os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses (item 4.4.3). Sete dias antes do final do período experimental, todas as ratas foram sensibilizadas com uma solução de KLH e então, vinte e quatro horas antes do final do período experimental, as ratas tiveram seus coxins plantares direito e esquerdo medidos com paquímetro e anotados, após este procedimento, as ratas receberam por via intradérmica no coxim plantar direito, o desafio imunológico, por meio da inoculação de uma solução denominada de *heat-aggregated* KLH. No dia seguinte, o “tumor” gerado pelo desafio com KLH foi mensurado através de um paquímetro, conforme detalhadamente descrito no item 4.4.14.

5.7.1 Resultados

A tabela 16 mostra os dados relativos à reação do DTH de ratas adultas tratadas ou não com diferentes doses de ISOs por 28 dias. A análise estatística empregada (ANOVA) revelou não haver diferenças significantes nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos

Tabela 16 - Reação de hipersensibilidade tardia (*Delayed type hypersensitivity* – DTH) de ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavagem, durante 28 dias

Reação de hipersensibilidade tardia – DTH (mm)			
Doses de ISOs (em mg/kg)			
Co (n=10)	100 (n=10)	300 (n=10)	900 (n=10)
5,70 ± 0,30	5,70 ± 0,20	5,90 ± 0,70	5,20 ± 0,50

Os dados são apresentados como Média ± desvio padrão.

5.8 EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS B E T ESPLÊNICOS DE RATAS ADULTAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS OU NÃO COM DIFERENTES DOSES DE ISOs

Foram utilizadas 40 ratas as quais foram separadas em quatro grupos: um controle e 3 experimentais (n=10/grupo) que receberam, por gavagem, durante 28 dias as doses de 100 300 e 900mg/kg de ISOs, os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses (item 4.4.3). No último dia de experimentação (29º dia), todos os animais foram pesados e então submetidos à eutanásia por meio da decapitação, foram coletadas amostras de baço e, prepararam-se suspensões celulares deste órgão, para a realização da avaliação da linfoproliferação, através de citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.4.13.

5.7.1 Resultados

A tabela 17 mostra os resultados referentes à análise da proliferação de linfócitos T esplênicos, estimulados pelo mitógeno ConA, dos animais tratados ou não com as diferentes doses ISOs. A análise estatística ANOVA mostrou não haver diferenças significantes nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos. Da mesma forma, como verificado na tabela 18, a ANOVA mostrou não haver diferença significativa no índice de proliferação de linfócitos B estimulados por LPS.

Tabela 17 - Índice de proliferação de linfócitos T estimulados pela concanavalina A, em ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavage, durante 28 dias

Índice de proliferação			
Doses de ISOs (em mg/kg)			
Co ^a	100 ^a	300 ^a	900 ^a
1,20 ± 0,30	1,00 ± 0,20	1,10 ± 0,10	1,00 ± 0,10

^an=10 animais/grupo Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Tabela 18 - Índice de proliferação de linfócitos B estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), em ratas adultas ovariectomizadas tratadas ou não (controle) com 100, 300 e 900mg/kg de ISOs, por gavage, durante 28 dias

Índice de proliferação			
Doses de ISOs (em mg/kg)			
Co ^a	100 ^a	300 ^a	900 ^a
1,10 ± 0,10	1,10 ± 0,10	1,10 ± 0,20	1,20 ± 0,20

^an=10 animais/grupo Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a utilização de plantas medicinais seja na forma de suplementos ou de fitoterápicos é praticada por mais de 80% da população mundial e movimenta em torno de US\$ 34 bilhões/ ano (MAINARDI; KAPOOR; BIELORY, 2009). No Brasil, estima-se que este mercado gire em torno de US\$ 160 milhões/ano, apresentando taxa de crescimento anual quatro vezes maior do que o observado nas vendas de medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008).

Entre os fitoterápicos comumente utilizados destacam-se as ISOs da soja, também chamadas de fitoestrógenos devido à semelhança de suas estruturas químicas a do estrógeno (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000). Consequentemente, as ISOs têm sido amplamente prescritas como substitutas à reposição hormonal com estrogênio, uma vez que esta terapia é restrita às condições específicas devido à ocorrência de efeitos colaterais, incluindo a indução de diferentes tipos de neoplasias, como o câncer endometrial (ISLANDER et al., 2011), o aumento do risco de acidente vascular cerebral e de doenças cardíacas (ROSS et al., 2000). Vale ressaltar que de fato, as ISOs têm sido efetivas em aliviar os sintomas da menopausa (CARMIGNANI et al., 2010).

Entretanto, como revisto recentemente, as pesquisas sobre o uso de fitoestrógenos ao invés da reposição hormonal convencional são relativamente novas e ainda são necessários outros estudos que comprovem o seu uso seguro (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013). Deste modo, no presente estudo buscou-se avaliar os efeitos das ISOs sobre parâmetros bioquímicos e de atividade do sistema imune em modelo experimental de pós-menopausa utilizando ratas ovariectomizadas, sendo avaliadas a dose 100 mg/kg e duas doses maiores (300 e 900 mg/kg).

Um dos efeitos da ovariectomia em roedores é a obesidade, que ocorre rapidamente, porém é prevenida pela administração de estrógeno (NORMAN; FLIGHT; REES, 2000). De fato, os adipócitos expressam receptores de estrógeno e a ação deste hormônio influencia não só a distribuição da gordura corpórea como também o perfil lipídico circulante (TURGEON et al., 2006). No presente estudo, a administração das ISOs na dose terapêutica (100 mg/kg) também preveniu o rápido ganho de peso observado nas ratas controles (Figura 5) sem ter alterado o consumo de ração entre estes dois grupos (Figura 4), evidenciando a ação estrogênica destes

fitoestrógenos. Entretanto, a administração das doses mais elevadas de ISOs resultou em diminuição significativa do consumo de ração com consequente redução do peso de todas as ratas destes grupos (Figura 5).

A genisteína, uma das principais ISOs da soja, já foi relacionada à menor ingestão de alimentos em roedores ovariectomizados (NAAZ et al., 2003; KIM et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Além disto, a genisteína mostrou efeito pró-apoptótico em adipócitos (NAAZ et al., 2003; KIM et al., 2006). Assim, pode-se sugerir que a redução do consumo de ração e do peso das ratas tratadas com as maiores doses de ISOs seja decorrente da ação direta da genisteína nos adipócitos e também na diminuição da ingesta de ração.

Considerando o perfil lipídico circulante, é sabido que a deficiência de estrógeno rapidamente altera este perfil de antiaterogênico ($\uparrow$ HDL $\downarrow$ LDL $\downarrow$ triglicérides) para aterogênico ($\downarrow$ HDL $\uparrow$ LDL $\uparrow$ triglicérides) (JENSEN; NILAS; CHRISTIANSEN, 1990; BRUSCHI et al., 1996). Sobre estes parâmetros, estudos recentes mostraram que as ISOs atuam melhorando o perfil lipídico (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013; MOHAMMADSHAH et al., 2013; SIRIWARDHANA et al., 2013), devido ao aumento da atividade antioxidante do plasma, diminuição das espécies reativas de oxigênio (ROS), aumento dos níveis de HDL e redução tanto do colesterol total quanto do LDL (BYUN; HAN; LEE, 2010; CURTIS et al., 2012). Todavia, nosso estudo revelou que as ratas tratadas com as ISOs apresentaram diminuição nos níveis de HDL e apesar de não terem sido determinados os níveis de LDL com o uso de um kit específico, o emprego da equação de Friedewald ($LDL = \text{colesterol total} - HDL - (\text{triglicerídeos}/5)$) com os dados aqui obtidos, podem sugerir um aumento nos níveis de LDL nas ratas tratadas com a ISO. No entanto, não restam dúvidas que a determinação quali e quantitativa deste parâmetro bioquímico deve ser realizada para confirmar um possível efeito aterogênico das ISOs, diferente do que propõe a literatura.

As ROS, entre elas o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $OH^{\cdot-}$ são moléculas de meia-vida curta, geradas por produtos do metabolismo. Elas reagem rapidamente com os componentes celulares causando danos nos lipídios circulantes, membranas celulares, proteínas e DNA (DROGE, 2002; WIDLANSKY et al., 2003). A inibição da formação de ROS ou o sequestro destas moléculas previne este estresse oxidativo (HERMANN; ZEIHNER; DIMMELER, 1997). Assim, é crescente a utilização de compostos antioxidantes, principalmente na dieta, entre eles as ISOs para prevenção

e redução dos efeitos lesivos desencadeados pelo estresse oxidativo (AVIRAM; FUHRMAN, 1998; BENZIE, 2003).

A ação antioxidante das ISOs e outros, como as vitaminas C e E, as proantocianidinas e diversas substâncias antioxidantes, ocorre devido esses compostos serem ricos em elétrons e possuírem a habilidade de doar estas partículas subatômicas para as ROS de forma direta ou pela transferência de um átomo de hidrogênio (ZAI-QUN, 2014). Desta forma, os antioxidantes passam então a ser oxidados.

O fator determinante para que um antioxidante seja realmente eficaz é a estabilidade que o composto oxidado tem, ou seja, se este composto for estável a reação é interrompida, caso contrário, o composto oxidado instável assume a natureza de pró-oxidante e volta a reagir com as moléculas de oxigênio e outros radicais oxidando novas moléculas (ZAI-QUN, 2014). Vários são os fatores que favorecem a instabilidade destes compostos, dentre eles pode-se destacar a ingestão de doses elevadas de antioxidantes, variações de pH do soro e da concentração de glutathione (RIETJENS et al., 2002; ZAI-QUN, 2014).

Levando em consideração que a indução do dano oxidativo é um dos fatores mais importantes para o aumento da formação de LDL oxidada e para diminuição dos níveis de HDL (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012; YANG; MOHAMED; ZHOU, 2012), pode-se supor que a diminuição dos níveis de HDL e o possível aumento dos níveis de LDL aqui calculados com as diferentes doses de ISOs podem ter sido resultantes de uma atividade pró-oxidante de altas doses de ISOs. Assim, para melhor esclarecer essa hipótese decidiu-se avaliar os níveis de glutathione de ratas tratadas ou não com as diferentes doses de ISOs.

A glutathione é um potente antioxidante endógeno formado pela união de três aminoácidos (γ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina) e possui papel central na biotransformação, eliminação de xenobióticos e na proteção das células contra o estresse oxidativo (HUBER; ALMEIDA, 2008). É encontrada em duas formas, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e a razão entre estas (GSH/GSSG) é fundamental para a determinação do estresse oxidativo endógeno, sendo considerado maior o estresse oxidativo quanto menor esta razão (HUBER; ALMEIDA, 2008). De fato, as ratas tratadas com a maior dose de ISOs apresentaram aumento significativo nas concentrações de GSSG e redução na razão GSH/GSSG (Figura 11).

De forma geral, em situações de homeostase, apenas pequenas concentrações de GSSG são encontradas (SCHULZ et al., 2000). Portanto, o aumento dos níveis da forma oxidada da glutathione observado neste estudo possivelmente está relacionado a alteração na sinalização redox e a um possível efeito pró-oxidante de altas doses de ISOs, que consequentemente poderia favorecer ao maior nível de oxidação das moléculas de LDL. Corrobora esta hipótese o estudo de Bowry e Stocker (1993) que demonstrou que a administração de vitamina E como única fonte de compostos antioxidantes favoreceu a oxidação da LDL (BOWRY; STOCKER, 1993). No entanto, mais uma vez, esse dado deve ser interpretado com cautela, pois os níveis de LDL foram determinados utilizando uma metodologia de estimação matemática clássica, e outros experimentos são necessários para avaliar diretamente os níveis de LDL oxidada.

Ainda em relação à avaliação bioquímica sérica, o presente estudo revelou que ratas tratadas com ISOs apresentaram níveis de glicose aumentados de forma dose-dependente (Tabela 8). Sabe-se que a genisteína prejudica a captação de glicose e o efluxo deste carboidrato em eritrócitos humanos através de seus efeitos no transportador de glicose 1 (GLUT1) (CHOU et al., 2010). A genisteína também inibe o transportador de glicose 4 (GLUT4) em adipócitos de ratos (BAZUINE; VAN DEN BROEK; MAASSEN, 2005). Além disto, um estudo *in vivo* utilizando ratos diabéticos revelou que o tratamento com genisteína reduziu os níveis de glicose da retina destes animais, devido a sua capacidade de ligação a GLUT1, o único transportador de glicose entre o sangue e a retina (LU et al., 2013). Assim, é possível sugerir que o aumento da glicemia observado no presente estudo pode ser resultado da menor absorção de glicose por diferentes tipos de células, devido aos efeitos inibitórios da genisteína em proteínas tirosina quinases (PTKs) (AKIYAMA et al., 1987), as quais são importantes para a translocação da GLUT na membrana plasmática de células de mamíferos e no transporte de glicose do sangue para as células (SMITH et al., 1993; CHOU et al., 2010)

Além disto, sabe-se que a reabsorção de glicose nos túbulos contornados distais é realizada por um mecanismo de cotransporte de íons sódio (Na^+) e glicose (MACHADO, 1998). Quadros hiperglicêmicos induzem a maior atividade de PTKs favorecendo a produção de ROS nos túbulos contornados distais, que consequentemente ativam o fator de transcrição nuclear NF κ B. Este, por sua vez,

inibe o cotransportador de Na^+ /glicose estimulando a excreção de glicose na urina (SU, 2009).

Desta forma, outro mecanismo que pode estar envolvido com o aumento da glicemia nas ratas tratadas com ISOs é a menor excreção urinária de glicose, uma vez que as ISOs antagonizam os efeitos de NF κ B (SU, 2009) e também inibem a atividade de PTKs. De fato, a análise bioquímica da urina destas ratas mostrou diminuição na glicosúria de forma dose-dependente, embora sem significância estatística quando comparado ao grupo controle (Tabela 9).

Outras células que sofrem a ação direta dos hormônios sexuais são as células do sistema imune, já que expressam receptores de estrógeno e de progesterona. Os linfócitos, macrófagos, células NK e DC expressam ER α , dos quais os linfócitos T CD4 $^+$ têm a maior expressão deste receptor e os linfócitos B de ER β . Por outro lado, os linfócitos T CD8 $^+$ e os monócitos expressam pouco ERs, mas expressam PR- α (VRACHNIS et al., 2014).

É sabido que o período pós-menopausa, natural ou induzido por ovariectomia, na mulher é marcado com alterações tanto no número de linfócitos ($\downarrow$ linfócitos B, $\downarrow$ CD4/CD8 e $\uparrow$ NK) como na capacidade de resposta ($\downarrow$ resposta à vacinação) e padrão de citocinas ($\uparrow$ citocinas inflamatórias), porém ainda é incerto se a reposição hormonal tem algum papel para evitar tais alterações (TURGEON et al., 2006; VRACHNIS et al., 2014).

Em busca de verificar se as ISOs atuam sobre o sistema imune fez-se a avaliação de órgãos linfoides e suas celularidades, assim como a imunofenotipagem dos linfócitos circulantes e esplênicos. Na avaliação do timo foi observada diminuição do peso absoluto, mas não do peso relativo, nos dois grupos de maiores doses (Figura 7), nos quais todas as ratas apresentaram redução de peso em todo período experimental (Figura 5). Contrariamente, o peso absoluto do baço manteve-se constante entre todos os grupos, porém houve aumento do peso relativo nos dois grupos tratados com as maiores doses das ISOs (Figura 6). Ainda, é importante ressaltar que a celularidade do baço permaneceu inalterada entre todos os grupos (Tabela 5).

Por conseguinte, pode-se sugerir que tais alterações nos pesos destes órgãos linfoides foram consequentes, pelo menos em parte, a diminuição do peso destes animais e não devido à modulação imunológica, evidenciando a diminuição apenas do peso absoluto do timo e aumento apenas do peso relativo do baço. Corroborar esta

hipótese o fato do tamanho do timo ser significativamente afetado pelo estado nutricional e, portanto, funcionar como "barômetro da nutrição" (CHANDRA, 1992; PRENTICE, 1999) e a diminuição de seu tamanho ser diretamente correlacionada à desnutrição em recém-nascidos (VARG et al., 2011).

Em camundongas adultas ovariectomizadas (70 dias de idade), foi demonstrado que a administração subcutânea de 200 mg/kg/dia de genisteína por 21 dias teve efeitos supressores no peso do timo e celularidade, sendo observada diminuição de timócitos CD4⁺CD8⁻ e CD4⁺CD8⁺ e, ao avaliarem se o bloqueio dos receptores de estrógeno reverteria este efeito, observaram apenas reversão parcial evidenciando que o efeito supressor e pró-apoptótico da genisteína no timo não foi apenas por ação em ERs (YELLAYI et al., 2002). Ainda neste trabalho, observaram linfocitopenia e diminuição de linfócitos T CD4⁺ no baço de camundongas jovens ovariectomizadas (30 dias de idade) tratadas com 80 mg/kg/dia de genisteína por 5 semanas pela via subcutânea. De fato, a genisteína exerce seu efeito pró-apoptótico não apenas modulando os receptores ER α e ER β , mas também, inibindo a atividade das enzimas tirosina quinase e topoisomerase II, moléculas fundamentais nos processos proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular (YELLAYI et al., 2002).

Em ratos machos expostos durante todo o período de gestação e lactação a 300 mg/kg de genisteína na dieta materna, foi observado aos 70 dias de idade, maior peso relativo do timo sem alteração da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ no timo e baço, porém aumento do total de linfócitos T e T CD8⁺ no baço (KLEIN et al., 2002). Levando em consideração este conjunto de dados, fica evidente que os efeitos das ISOs sobre os linfócitos, pelo menos da genisteína, variam bastante com a dose administrada e também com a idade da exposição.

No presente estudo, entretanto, não foram observadas alterações no hemograma e na fenotipagem dos linfócitos circulantes e esplênicos das ratas adultas ovariectomizadas em nenhuma das doses de ISOs avaliadas (Tabelas 7, 12 e 13). Porém, na avaliação da proporção CD4/CD8 dos linfócitos circulantes foi observado discreto aumento no grupo de maior dose (Tabela 12), aparentemente, sem efeito biológico significativo, uma vez que não houve alterações nas populações envolvidas.

No passo seguinte foi feita a avaliação da resposta celular inata de ratas tratadas com diferentes doses de ISOs. A imunidade inata é a linha de defesa inicial contra os microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os principais

componentes da resposta inata são as barreiras físicas e químicas, como as superfícies epiteliais, sistema complemento, citocinas e também as células NK e os fagócitos, principalmente, os neutrófilos e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os fagócitos são células cuja função principal é identificar, ingerir e destruir microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). De forma geral, estas células protegem o hospedeiro após serem recrutadas para os locais de infecção, reconhecerem os microrganismos invasores e, em seguida, realizarem a ingestão, através do processo de fagocitose e destruição dos patógenos ingeridos por meio do *burst* oxidativo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Além disto, os fagócitos produzem citocinas que atuam tanto na resposta imune inata quanto adquirida e também na reparação tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Neste estudo foi observado que os neutrófilos das ratas tratadas com 300 mg/kg de ISOs apresentaram intensidade de fagocitose aumentada quando coincubados com *Staphylococcus aureus* e, de maneira inversa, os macrófagos peritoneais das ratas tratadas com 900 mg/kg de ISOs apresentaram intensidade de fagocitose reduzida (Tabelas 14 e 15).

De fato, diversos autores demonstraram os efeitos imunomodulatórios das ISOs sobre a atividade de macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por exemplo, sabe-se que a genisteína inibe a produção de prostaglandina E₂, óxido nítrico e COX 2 frente a exposição ao LPS (MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012). Ainda, sabe-se que tanto a genisteína quanto a daidzeína e o equol inibem a produção de duas importantes citocinas pró-inflamatórias, o TNF α e a interleucina 1 (IL1) (DAVIS et al., 2001; KANG et al., 2005; YANAGISAWA et al., 2012; JIA et al., 2013). O TNF α é uma das principais citocinas produzidas por macrófagos ativados e tem como principal função o aumento da fagocitose e do potencial microbida (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). Assim, poder-se-ia supor que a administração de doses elevadas de ISOs tivesse suprimido a produção de TNF α pelos macrófagos e consequentemente a fagocitose, porém ao se avaliar a capacidade microbida destas células, pela medida de *burst* oxidativo, foi verificado que esta se manteve inalterada entre os grupos e, portanto, esta hipótese descartada.

Ainda, é importante ressaltar que tanto os macrófagos de animais do grupo controle quanto macrófagos dos animais tratados com diferentes doses de ISOs apresentaram altos níveis basais de *burst* oxidativo, fator que indubitavelmente

prejudica uma correta interpretação dos resultados obtidos, sendo necessário então, cautela na análise desse experimento.

Outro efeito anti-inflamatório atribuído a genisteína decorre da capacidade desta aglicona bloquear os receptores do tipo Toll 4 (TLR4) (JEONG et al., 2014). Estes receptores transmembranares são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares de vários patógenos como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* entre outros e são expressos em monócitos, macrófagos, neutrófilos e também em células dendríticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Entretanto o reconhecimento do *Staphylococcus aureus* patógeno empregado no presente estudo se dá através dos receptores do tipo Toll 2 (PIETROCOLA et al., 2011). Deste modo, a diminuição da fagocitose pelos macrófagos das ratas tratadas com 900 mg/kg de ISOs ainda não pode ser atribuída ao bloqueio desses receptores uma vez que não há relatos na literatura demonstrando a ação das ISOs nestes receptores.

Considerando o papel dos macrófagos também na resposta celular adaptativa como célula efetora e produtora de IFN γ (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014), na etapa seguinte foi feita a avaliação da resposta celular do tipo tardia (DTH). Esta resposta é mediada por linfócitos T helper 1 (Th1) a partir do segundo contato com mesmo antígeno e, então, migram para o local infectado em resposta a liberação de quimiocinas por células endoteliais e a expressão de moléculas de adesão que seletivamente permitem a migração tanto dos linfócitos Th1 quanto dos macrófagos (SALLUSTO; LANZAVECCHIA; MACKAY, 1998). No local infectado os linfócitos Th1 secretam IFN γ que ativa os macrófagos aumentando sua capacidade bactericida. Os resultados obtidos na avaliação desta resposta no presente estudo não mostraram diferenças entre os grupos (Tabela 16) e, portanto, pode-se concluir que a administração de ISOs, mesmo em doses elevadas, não alterou a capacidade de resposta dos macrófagos e linfócitos Th1.

Contrariamente, outros estudos demonstraram que a administração de genisteína (8 – 80 mg/kg), pela via subcutânea, em camundongas jovens ovariectomizadas (30 dias de idade), promoveu diminuição na DTH destes animais (YELLAYI et al., 2003). Esta ação da genisteína se deve apenas parcialmente a sua ligação em ERs, uma vez que a administração simultânea com um inibidor dos receptores de estrógeno não restabeleceu a resposta de DTH completamente.

Por fim, foi feita a avaliação da proliferação policlonal de linfócitos T em resposta a ConA e de linfócitos B em resposta ao LPS. Estudo anterior mostrou que linfócitos humanos coincubados com genisteína e mitógenos derivados de lectinas de planta, como phytohemaglutinina A (PHA), Concanavalina A (ConA) e Pokeweed (PWM), que estimulam a proliferação de linfócitos T com exceção do PWM que estimula linfócitos T e B, proliferaram menos de maneira dose-dependente, devido a menor expressão de moléculas de ativação e diferenciação na superfície dos linfócitos (RAPAPORT et al., 1997).

Por outro lado, foi demonstrado que a proliferação de linfócitos de camundongos coincubados com genisteína e ConA ou LPS não diferiram do controle, mas quando coincubados com daidzeína e ConA ou LPS foi observado aumento da proliferação de maneira dose-dependente (WANG, W.; HIGUCHI; ZHANG, 1997).

A discrepância dos dados quanto ao estímulo ou a inibição da proliferação de linfócitos *in vitro* coincubados com isoflavonas e mitógenos, pelo menos em parte, se deve a diferença na atividade das diferentes ISOs isoladas, nos protocolos de avaliação e doses utilizadas. No presente estudo, entretanto, fez-se a avaliação da proliferação de linfócitos T e B *ex vivo* não sendo observada alteração entre os linfócitos dos grupos tratados com ISOs aos do grupo controle (Tabelas 17 e 18) evidenciando que as ISOs não interferem na proliferação dos linfócitos T e B de ratas.

Como já mencionado anteriormente, apesar de apresentarem atividade estrogênica fraca quando comparada ao estrógeno endógeno (CLAPAUCH et al., 2002) as ISOs apresentam ação diferenciada e competitiva sobre os receptores estrogênicos, estimulando ou antagonizando os efeitos mediados pelo estrogênio (WOOD et al., 2006; MOUTSATSOU, 2007).

Neste estudo ficou evidente que a utilização das ISOs da soja na apresentação não isolada não induziu melhora no perfil lipídico, na proteção ao estresse oxidativo e nem alterou a capacidade de resposta do sistema imune de ratas ovariectomizadas. Além disto, a exposição a doses mais elevadas de ISOs mostrou potente efeito sobre a ingesta de alimentos, piora do perfil lipídico tornando-se aterogênico, aumento de glicemia e alteração na sinalização redox das células, portanto, futuros experimentos são necessários para melhor caracterizar os efeitos destas agliconas sobre o metabolismo dos lipídeos e também na proteção ao estresse oxidativo.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- O tratamento com as ISOs, nas doses de 300 e 900 mg/kg diminuiu o consumo de ração e o ganho de peso.
- O tratamento com as ISOs não alterou a contagem de eritrócitos e leucócitos no sangue.
- O tratamento com as ISOs diminuiu os níveis de HDL e glicose de forma dose-dependente.
- O tratamento com as ISOs aumentou o peso relativo do baço e diminuiu o peso absoluto do timo, entretanto, não promoveu nenhuma alteração na histologia destes órgãos linfoides.
- O tratamento com as ISOs não alterou o fenótipo e a capacidade de proliferação de linfócitos
- O tratamento com as ISOs, na dose de 300 mg/kg aumentou a intensidade de fagocitose de neutrófilos circulantes.
- O tratamento com as ISOs, na dose de 900 mg/kg diminuiu a intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais.
- O tratamento com as ISOs não alterou a resposta de hipersensibilidade tardia.
- O tratamento com as ISOs, na dose de 900 mg/kg aumentou a concentração de glutathiona oxidada e alterou a razão glutathiona reduzida/oxidada.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens - epidemiology and a possible role in cancer protection. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 7, p. 103-112, 1995.
- AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5592-5595, 1987.
- ALEKEL, D. L.; VAN LOAN, M. D.; KOEHLER, K. J.; HANSON, L. N.; STEWART, J. W.; HANSON, K. B.; KURZER, M. S.; PETERSON, C. T. The Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss (SIRBL) Study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 218-230, 2010.
- ALLRED, C. D.; JU, Y. H.; ALLRED, K. F.; CHANG, J.; HELFERICH, W. G. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p. 1667-1673, 2001.
- APPELT, L. C.; REICKS, M. M. Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 10, p. 1820-1826, 1999.
- ARTS, J.; KUIPER, G. G.; JANSSEN, J. M.; GUSTAFSSON, J. A.; LOWIK, C. W.; POLS, H. A.; VAN LEEUWEN, J. P. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 5067-5070, 1997.
- ATLURU, D.; JACKSON, T. M.; ATLURU, S. Genistein, a selective protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits interleukin-2 and leukotriene B4 production from human mononuclear cells. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 59, n. 3, p. 379-387, 1991.
- AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 137, p. S45-50, 1998. Supplement, S45-50.
- BAEZA, I.; DE CASTRO, N. M.; ALVARADO, C.; ALVAREZ, P.; ARRANZ, L.; BAYON, J.; DE LA FUENTE, M. Improvement of immune cell functions in aged mice treated for five weeks with soybean isoflavones. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1100, p. 497-504, 2007.
- BAEZA, I.; DE CASTRO, N. M.; ARRANZ, L.; DE LA FUENTE, M. Soybean and green tea polyphenols improve immune function and redox status in very old ovariectomized mice. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 6, p. 665-674, 2010.

- BALMIR, F.; STAACK, R.; JEFFREY, E.; JIMENEZ, M. D.; WANG, L.; POTTER, S. M. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 12, p. 3046-3053, 1996.
- BAO, Z. S.; HONG, L.; GUAN, Y.; DONG, X. W.; ZHENG, H. S.; TAN, G. L.; XIE, Q. M. Inhibition of airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by soy isoflavone in a murine model of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 8, p. 899-906, 2011.
- BARNES, S.; KIM, H. Soy isoflavones, estrogens, and growth factor signaling. **Soy Connection**, v. 6, p. 1-5, 1995.
- BARNES, S.; BOERSMA, B.; PATEL, R.; KIRK, M.; DARLEY-USMAR, V. M.; KIM, H.; XU, J. Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action. **Biofactors**, v. 12, n. 1-4, p. 209-215, 2000.
- BAZUINE, M.; VAN DEN BROEK, P. J. A.; MAASSEN, J. A. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 2, p. 511-514, 2005.
- BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, v. 56, n. 3, p. 335-344, 1989.
- BECK, V. B.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 5, p. 499-518, 2005.
- BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n.4, p. 400-419, 2013.
- BELLOU, S.; KARALI, E.; BAGLI, E.; AL-MAHARIK, N.; MORBIDELLI, L.; ZICHE, M.; ADLERCREUTZ, H.; MURPHY, C.; FOTSIS, T. The isoflavone metabolite 6-methoxyequol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. **Molecular Cancer**, v. 11, p. 35, 2012.
- BENZIE, I. F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 136, n. 1, p. 113-126, 2003.
- BERNHEIM, F.; BERNHEIM, M.L.C.; WILBUR, K.M. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.174, p. 257-264, 1948.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrinology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.
- BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 157-177, 2001.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA, 1987. 2014.

BOWRY, V. W.; STOCKER, R. Tocopherol-mediated peroxidation: the prooxidation effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, p. 6029-6044, 1993.

BRUSCHI, F.; MESCHIA, M.; SOMA, M.; PEROTTI, D.; PAOLETTI, R.; CROSIGNANI, P. G. Lipoprotein(a) and other lipids after oophorectomy and estrogen replacement therapy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 88, n. 6, p. 950-954, 1996.

BYUN, J. S.; HAN, Y. S.; LEE, S. S. The effects of yellow soybean, black soybean, and sword bean on lipid levels and oxidative stress in ovariectomized rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 80, n. 2, p. 97-106, 2010.

CARMIGNANI, L. O.; PEDRO, A. O.; COSTA-PAIVA, L. H.; PINTO-NETO, A. M. The effect of dietary soy supplementation compared to estrogen and placebo on menopausal symptoms: A randomized controlled trial. **Maturitas**, v. 67, n. 3, p. 262-269, 2010.

CARSON-JURICA, M. A.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Steroid receptor family: structure and functions. **Endocrinology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 201-220, 1990.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; ELOIR, P. S. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRS, 2003, p.519-536.

CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1044-1062, 2000.

CASSIDY, A.; ALBERTAZZI, P.; NIELSEN, I. L.; HALL, W.; WILLIAMSON, G.; TETENS, I.; ATKINS, S.; CROSS, H.; MANIOS, Y.; WOLK, A.; STEINER, C.; BRANCA, F. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 1, p. 76-92, 2006.

CHANDRA, R. K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 597-600, 1992. Supplement.

CHEN, W. F.; HUANG, M. H.; TZANG, C. H.; YANG, M.; WONG, M. S. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1638, n. 2, p. 187-196, 2003.

CHEN, W. F.; WONG, M. S. Genistein enhances insulin-like growth factor signaling pathway in human breast cancer (MCF-7) cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 5, p. 2351-2359, 2004.

CHOI, C.; CHO, H.; PARK, J.; CHO, C.; SONG, Y. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NFkappaB activation in RAW 264.7 macrophages. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 9, p. 1916-1922, 2003.

CHOI, M. S.; RHEE, K. C. Production and processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human health. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2006.

CHOI, S. Y.; HA, T. Y.; AHN, J. Y.; KIM, S. R.; KANG, K. S.; HWANG, I. K.; KIM, S. Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. **Planta Medica**, v. 74, n. 1, p. 25-32, 2008.

CHOU, H. F.; CHUANG, K. H.; TSAI, Y. S.; CHEN, Y. J. Genistein inhibits glucose and sulphate transport in isolated rat liver lysosomes. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 2, p. 197-205, 2010.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P. M.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; PÓVOA, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

CLARK, J. H.; ERNEST, P. J. **Female sex steroids, receptors and function:** monographs on endocrinology. New York: Springer, 1979, v.14

CONSTANTINOU, A.; HUBERMAN, E. Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: possible mechanisms of action. **Procedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, n. 1, p. 109-115, 1995.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates - antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1961-1967, 1993.

COX, L.; LIU, J. H. Primary ovarian insufficiency: An update. **International Journal of Women's Health**, v. 6, n. 1, p. 235-243, 2014.

CURTIS, P. J.; DHATARIYA, K.; SAMPSON, M.; KROON, P. A.; POTTER, J.; CASSIDY, A. Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes: A 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. **Diabetes Care**, v. 35, n. 2, p. 226-232, 2012.

- CUTOLO, M.; CAPELLINO, S.; SULLI, A.; SERIOLI, B.; SECCHI, M. E.; VILLAGGIO, B.; STRAUB, R. H. Estrogens and autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1089, p. 538-547, 2006.
- DAVIS, J. N.; KUCUK, O.; DJURIC, Z.; SARKAR, F. H. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- κ B activation by TNF- α in blood lymphocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1293-1302, 2001.
- DAVIS, S. R.; MURKIES, A. L.; WILCOX, G. Phytoestrogens in clinical practice. **Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 27-34, 1998.
- DEROO, B. J.; KORACH, K. S. Estrogen receptors and human disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 561-570, 2006.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.
- DIJSSELBLOEM, N.; GORIELY, S.; ALBARANI, V.; GERLO, S.; FRANCOZ, S.; MARINE, J. C.; GOLDMAN, M.; HAEGEMAN, G.; VANDEN BERGHE, W. A critical role for p53 in the control of NF- κ B-dependent gene expression in TLR4-stimulated dendritic cells exposed to genistein. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5048-5057, 2007.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- EMBRAPA. **EMBRAPA soja**. 2014a. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja>>. Acesso em: 20 out. 2014.
- EMBRAPA. **Soja na Alimentação**. 2014b. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/>. Acesso em: 20 out. 2014.
- ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J. A. Oestrogen receptors - an overview. **Journal of Internal Medicine**, v. 246, n. 2, p. 133-138, 1999.
- EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 2014.
- ERICKSON, D. R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Saint Louis: AOAC Press, United Soybean Board, 1995. 584 p.
- ESTEVEZ, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.
- EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, n. 4854, p. 889-895, 1988.
- FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean Isoflavones: Effects of Processing and Health Benefits. **Food Reviews International**, v. 20, n. 1, p. 51-75, 2004.

- FLEURY, Y.; WELTI, D. H.; PHILIPPOSIAN, G.; MAGNOLATO, D. Soybean (malonyl) isoflavones - characterization and antioxidant properties. **Acs Symposium Series**, v. 507, p. 98-113, 1992.
- FRITZ, W. A.; COWARD, L.; WANG, J.; LAMARTINIERE, C. A. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 12, p. 2151-2158, 1998.
- GAO, Y. H.; YAMAGUCHI, M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 5, n. 3, p. 261-267, 2000.
- GENG, Y.; ZHANG, B. P.; LOTZ, M. Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 12, p. 6692-6700, 1993.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. A. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: Levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5987-5993, 2002.
- GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M. Avaliação do teor de isoflavonas de “suplementos nutricionais à base de soja”. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 159-167, 2003.
- GENOVESE, M. I.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 3, p. 205-211, 2005.
- GIACOMINI, D. R.; MELLA, E. A. C. Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens. **Semina: ciências biológicas e saúde**, v. 27, n. 1, p. 71-92, 2006.
- GIL-IZQUIERDO, A.; PENALVO, J. L.; GIL, J. I.; MEDINA, S.; HORCAJADA, M. N.; LAFAY, S.; SILBERBERG, M.; LLORACH, R.; ZAFRILLA, P.; GARCIA-MORA, P.; FERRERES, F. Soy isoflavones and cardiovascular disease epidemiological, clinical and -omics perspectives. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 624-631, 2012.
- GONZALEZ-GRANILLO, M.; STEFFENSEN, K. R.; GRANADOS, O.; TORRES, N.; KORACH-ANDRE, M.; ORTIZ, V.; AGUILAR-SALINAS, C.; JAKOBSSON, T.; DIAZ-VILLASENOR, A.; LOZA-VALDES, A.; HERNANDEZ-PANDO, R.; GUSTAFSSON, J. A.; TOVAR, A. R. Soy protein isoflavones differentially regulate liver X receptor isoforms to modulate lipid metabolism and cholesterol transport in the liver and intestine in mice. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2469-2478, 2012.
- GOODMAN-GRUEN, D.; KRITZ-SILVERSTEIN, D. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 4, p. 1202-1206, 2001.

GREENE, G. L.; GILNA, P.; WATERFIELD, M.; BAKER, A.; HORT, Y.; SHINE, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. **Science**, v. 231, n. 4742, p. 1150-1154, 1986.

GRONEMEYER, H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 89-123, 1991.

GROSSMAN, C. J. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. **Science**, v. 227, n. 4684, p. 257-261, 1985.

GRUN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C. Q.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J. L.; FERNANDO, L. N. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2839-2843, 2001.

GUO, T. L.; WHITE JR, K. L.; BROWN, R. D.; DELCLOS, K. B.; NEWBOLD, R. R.; WEIS, C.; GERMOLEC, D. R.; MCCAY, J. A. Genistein modulates splenic natural killer cell activity, antibody-forming cell response, and phenotypic marker expression in F0 and F1 generations of Sprague-Dawley rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 181, n. 3, p. 219-227, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HAYTOWITZ, D. B.; BHAGWAT, S. Assessment of Sources and Dietary Intake of Isoflavone in the US Diet. **Faseb Journal**, v. 23, p. 1, 2009.

HELFERICH, W. G.; ANDRADE, J. E.; HOAGLAND, M. S. Phytoestrogens and breast cancer: a complex story. **Inflammopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 219-226, 2008.

HENDRICH, S.; LEE, K. W.; XU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A. DEFINING FOOD COMPONENTS AS NEW NUTRIENTS. **Journal of Nutrition**, v. 124, n. 9, p. S1789-S1792, 1994.

HERMANN, C.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 12, p. 3588-3592, 1997.

HERMANN, F. J. A Revision of the genus glycine and its immediate allies. **Technical Bulletins of United States Department of Agriculture**, v. 1268, p. 87, 1962.

- 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 Research**, v. 58, n. 17, p. 3833-3838, 1998.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- IRVINE, C. H.; SHAND, N.; FITZPATRICK, M. G.; ALEXANDER, S. L. Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6 p. 1462s-1465s, 1998. Supplement.
- ISLANDER, U.; JOCHEMS, C.; LAGERQUIST, M. K.; FORSBLAD-D'ELIA, H.; CARLSTEN, H. Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 14-29, 2011.
- JACOBSEN, B. K.; KNUTSEN, S. F.; FRASER, G. E. Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist Health Study (United States). **Cancer Causes Control**, v. 9, n. 6, p. 553-557, 1998.
- JENSEN, J.; NILAS, L.; CHRISTIANSEN, C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. **Maturitas**, v. 12, n. 4, p. 321-331, 1990.
- JEONG, J. W.; LEE, H. H.; HAN, M. H.; KIM, G. Y.; KIM, W. J.; CHOI, Y. H. Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 212, p. 30-39, 2014.
- JIA, Z.; BABU, P. V. A.; SI, H.; NALLASAMY, P.; ZHU, H.; ZHEN, W.; MISRA, H. P.; LI, Y.; LIU, D. Genistein inhibits TNF- α -induced endothelial inflammation through the protein kinase pathway A and improves vascular inflammation in C57BL/6 mice. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 3, p. 2637-2645, 2013.
- KANG, J. S.; YOON, Y. D.; HAN, M. H.; HAN, S. B.; LEE, K.; KANG, M. R.; MOON, E. Y.; JEON, Y. J.; PARK, S. K.; KIM, H. M. Estrogen receptor-independent inhibition of tumor necrosis factor- α gene expression by phytoestrogen equol is mediated by blocking nuclear factor-kappa B activation in mouse macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 136-143, 2005.
- KANG, J. S.; YOON, Y. D.; HAN, M. H.; HAN, S. B.; LEE, K.; PARK, S. K.; KIM, H. M. Equol inhibits nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression through down-regulating the activation of Akt. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 491-499, 2007.
- KASUM, M.; BEKETIĆ-OREŠKOVIĆ, L.; PEDDI, P. F.; OREŠKOVIĆ, S.; JOHNSON, R. H. Fertility after breast cancer treatment. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 173, n. 1, p. 13-18, 2014.

- KIM, H. K.; NELSON-DOOLEY, C.; DELLA-FERA, M. A.; YANG, J. Y.; ZHANG, W.; DUAN, J. H.; HARTZELL, D. L.; HAMRICK, M. W.; BAILE, C. A. Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 2, p. 409-414, 2006.
- KLEIN, S. L.; WISNIEWSKI, A. B.; MARSON, A. L.; GLASS, G. E.; GEARHART, J. P. Early exposure to genistein exerts long-lasting effects on the endocrine and immune systems in rats. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 11, p. 742-749, 2002.
- KLISH, W. J.; BAKER, S. S.; COCHRAN, W. J.; FLORES, C. A.; GEORGIEFF, M. K.; JACOBSON, M. S.; LAKE, A. M.; BLUM, D.; HARRIS, S. S.; HUBBARD, V. S.; LEVIN, E.; PRENDERGAST, A.; SMITH, A. E.; YETLEY, E.; ZLOTKIN, S.; LAUER, R. M. Soy protein-based formulas: Recommendations for use in infant feeding. **Pediatrics**, v. 101, n. 1, p. 148-153, 1998.
- KORACH, K. S. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1524-1527, 1994.
- KRUST, A.; GREEN, S.; ARGOS, P.; KUMAR, V.; WALTER, P.; BORNERT, J. M.; CHAMBON, P. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. **The Embo Journal**, v. 5, n. 5, p. 891-897, 1986.
- KUIPER, G.; ENMARK, E.; PELTOHUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, n. 12, p. 5925-5930, 1996.
- KUIPER, G. G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-870, 1997.
- KUMI-DIAKA, J. K.; HASSANHI, M.; MERCHANT, K.; HORMAN, V. Influence of genistein isoflavone on matrix metalloproteinase-2 expression in prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 4, p. 491-497, 2006.
- LAVENS, S. E.; PEACHELL, P. T.; WARNER, J. A. Role of tyrosine kinases in IgE-mediated signal transduction in human lung mast cells and basophils. **American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology**, v. 7, n. 6, p. 637-644, 1992.
- LEE, H. P.; GOURLEY, L.; DUFFY, S. W.; ESTEVE, J.; LEE, J.; DAY, N. E. Dietary effects on breast-cancer risk in singapore. **Lancet**, v. 337, n. 8751, p. 1197-1200, 1991.
- LINDAHL, S. H. Reviewing the options for local estrogen treatment of vaginal atrophy. **International Journal of Women's Health**, v. 6, n. 1, p. 307-312, 2014.

- LIU, J.; CHANG, S. K.; WIESENBORN, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2333-2340, 2005.
- LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.
- LÖNN, M. E.; DENNIS, J. M.; STOCKER, R. Actions of antioxidants in the protection against atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 4, p. 863-884, 2012.
- LU, L. J. W.; ANDERSON, K. E.; GRADY, J. J.; KOHEN, F.; NAGAMANI, M. Decreased ovarian hormones during a soya diet: Implications for breast cancer prevention. **Cancer Research**, v. 60, n. 15, p. 4112-4121, 2000.
- LU, L. L.; SEIDEL, C. P.; IWASE, T.; STEVENS, R. K.; GONG, Y. Y.; WANG, X. Y.; HACKETT, S. F.; CAMPOCHIARO, P. A. Suppression of GLUT1; A new strategy to prevent diabetic complications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 2, p. 251-257, 2013.
- LUCKI, N. C.; SEWER, M. B. Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAH1) gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 19399-19409, 2011.
- MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.
- MAINARDI, T.; KAPOOR, S.; BIELORY, L. Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, p. 283-294, 2009.
- MARTIN, J. T. Sexual dimorphism in immune function: the role of prenatal exposure to androgens and estrogens. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 251-261, 2000.
- MASILAMANI, M.; WEI, J.; BHATT, S.; PAUL, M.; YAKIR, S.; SAMPSON, H. A. Soybean isoflavones regulate dendritic cell function and suppress allergic sensitization to peanut. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1242-1250.e1241, 2011.
- MASILAMANI, M.; WEI, J.; SAMPSON, H. A. Regulation of the immune response by soybean isoflavones. **Immunologic Research**, v. 54, n. 1-3, p. 95-110, 2012.
- MCEWEN, B. S.; ALVES, S. E. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocrinology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 279-307, 1999.
- MESSINA, M.; NAGATA, C.; WU, A. H. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. **Nutrition and Cancer**, v. 55, n. 1, p. 1-12, 2006.

- MOHAMMADSHAHI, M.; HAIDARI, F.; SAEI, A. A.; RASHIDI, B.; MAHBOOB, S.; RASHIDI, M. R. Soy protein, genistein, and daidzein improve serum paraoxonase activity and lipid profiles in rheumatoid arthritis in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 2, p. 147-154, 2013.
- MOREIRA, A. C.; SILVA, A. M.; SANTOS, M. S.; SARDÃO, V. A. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 61-71, 2014.
- MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Letters**, v. 392, n. 1, p. 49-53, 1996.
- MOUTSATSOU, P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. **Hormones (Athens)**, v. 6, n. 3, p. 173-193, 2007.
- MURPHY, P. A.; SONG, T. T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K.; BEECHER, G. R.; TRAINER, D.; HOLDEN, J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2697-2704, 1999.
- NAAZ, A.; YELLAYI, S.; ZAKROCZYMSKI, M. A.; BUNICK, D.; DOERGE, D. R.; LUBAHN, D. B.; HELFERICH, W. G.; COOKE, P. S. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3315-3320, 2003.
- NIKANDER, E.; METSA-HEIKKILA, M.; YLIKORKALA, O.; TIITINEN, A. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. The **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 3, p. 1207-1212, 2004.
- NORMAN, R. J.; FLIGHT, I. H.; REES, M. C. Oestrogen and progestogen hormone replacement therapy for peri-menopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution. **Cochrane Database Syst Reviews**, v. 2, p. Cd001018, 2000.
- O'NEILL, B. A scientific review of the reported effects of vegan nutrition on the occurrence and prevalence of cancer and cardiovascular disease. **Bioscience Horizons**, v. 2010, n. 3, p. 197-212, 2010.
- OGAWA, S.; INOUE, S.; WATANABE, T.; HIROI, H.; ORIMO, A.; HOSOI, T.; OUCHI, Y.; MURAMATSU, M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, n. 1, p. 122-126, 1998.
- OLSEN, N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocrinology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 369-384, 1996.
- PARK, D.; HUANG, T.; FRISHMAN, W. H. Phytoestrogens as cardioprotective agents. **Cardiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 13-17, 2005.

- PATISAUL, H. B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, n. 4, p. 400-419, 2010.
- PIETROCOLA, G.; ARCIOLA, C. R.; RINDI, S.; DI POTO, A.; MISSINEO, A.; MONTANARO, L.; SPEZIALE, P. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 799-810, 2011.
- PINTO, M. D.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6340-6346, 2005.
- POLKOWSKI, K.; MAZUREK, A. P. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 57, n. 2, p. 135-155, 2000.
- 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. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 8, p. 2007-2011, 1996.
- POTTER, S. M.; BAUM, J. A.; TENG, H. Y.; STILLMAN, R. J.; SHAY, N. F.; ERDMAN, J. W. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1375S-1379S, 1998.
- PRENTICE, A. M. The thymus: A barometer of malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 5, p. 345-347, 1999.
- RAPAPORT, F. T.; TERASHIMA, T.; TSUKUDA, K.; KONO, K.; TAKAYAMA, T.; MALINOWSKI, K. Suppression of lectin, alloantigen, and xenoantigen-induced T-cell proliferation by genistein. **Transplantation Proceedings**, v. 29, n. 1-2, p. 1261-1264, 1997.
- RAZ, L. Estrogen and cerebrovascular regulation in menopause. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1-2, p. 22-30, 2014.
- RICKETTS, M. L.; MOORE, D. D.; BANZ, W. J.; MEZEI, O.; SHAY, N. F. Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 6, p. 321-330, 2005.
- RIETJENS, I.; BOERSMA, M. G.; DE HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; VAN ZANDEN, J. J.; VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G. M.; KOEMAN, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, n. 3-4, p. 321-333, 2002.
- RIMBACH, G.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; FRANK, J.; FUCHS, D.; WENZEL, U.; DANIEL, H.; HALL, W. L.; WEINBERG, P. D. Dietary isoflavones in the prevention of

- cardiovascular disease - A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1308-1319, 2008.
- ROSS, R. K.; PAGANINI-HILL, A.; WAN, P. C.; PIKE, M. C. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 4, p. 328-332, 2000.
- ROSSELLI, M.; REINHART, K.; IMTHURN, B.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 4, p. 332-350, 2000.
- ROSSI, E. A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A. R.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; ABDALLA, D. S. P.; TALARICO, V. H.; MINTO, D. F. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 93-99, 2004.
- SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **Journal of Medical Investigation**, v. 55, n. 3-4, p. 167-173, 2008.
- SAKAI, T.; FUROKU, S.; NAKAMOTO, M.; SHUTO, E.; HOSAKA, T.; NISHIOKA, Y.; SONE, S. The soy isoflavone equol enhances antigen-specific IgE production in ovalbumin-immunized BALB/c mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)**, v. 56, n. 1, p. 72-76, 2010.
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunology Today**, v. 19, n. 12, p. 568-574, 1998.
- SCHULZ, J. B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4904-4911, 2000.
- SCHUURS, A. H.; VERHEUL, H. A. Effects of gender and sex steroids on the immune response. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 157-172, 1990.
- SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 3, p. 758S-767S, 1999.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSCHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 447-453, 2002.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol - A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3577-3584, 2002.
- SETCHELL, K. D. R.; CLERICI, C. Equol: History, Chemistry, and Formation. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 7, p. 1355S-1362S, 2010.

- SEVERSON, R. K.; NOMURA, A. M.; GROVE, J. S.; STEMMERMANN, G. N. A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. **Cancer Research**, v. 49, n. 7, p. 1857-1860, 1989.
- SHELNUTT, S. R.; CIMINO, C. O.; WIGGINS, P. A.; RONIS, M. J. J.; BADGER, T. M. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 588-594, 2002.
- SHEU, F.; LAI, H. H.; YEN, G. C. Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1767-1772, 2001.
- SHIM, H. Y.; PARK, J. H.; PAIK, H. D.; NAH, S. Y.; KIM, D. S.; HAN, Y. S. Genistein-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves calpain-caspase and apoptosis signaling kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase activation cascades. **Anticancer Drugs**, v. 18, n. 6, p. 649-657, 2007.
- SIRIWARDHANA, N.; KALUPAHANA, N. S.; CEKANOVA, M.; LEMIEUX, M.; GREER, B.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 613-623, 2013.
- SMITH, R. M.; TIESINGA, J. J.; SHAH, N.; SMITH, J. A.; JARETT, L. Genistein inhibits insulin-stimulated glucose-transport and decreases immunocytochemical labeling of glut4 carboxyl-terminus without affecting translocation of glut4 in isolated rat adipocytes - additional evidence of glut4 activation by insulin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 1, p. 238-246, 1993.
- STARK, A.; MADAR, Z. Phytoestrogens: A review of recent findings. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 561-572, 2002.
- STEELE, M. S.; BENNETT, R. A. Clinical Technique: Dorsal Ovariectomy in Rodents. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, n. 3, p. 222-226, 2011.
- SU, S. L. Sodium-Glucose Transporter. **Formosan Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2009.
- TANTAMANGO-BARTLEY, Y.; JACELDO-SIEGL, K.; FAN, J.; FRASER, G. Vegetarian diets and the incidence of cancer in a low-risk population. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 2, p. 286-294, 2013.
- TEIXEIRA, A. S. Alimentos e alimentação dos animais. **UFLA – FAEPE**, v.1, n.1, p. 402, 1998.
- THAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASSELL, W. L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 7, p. 2223-2235, 1998.

- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.
- TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 451-486, 1994.
- TURGEON, J. L.; CARR, M. C.; MAKI, P. M.; MENDELSON, M. E.; WISE, P. M. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 6, p. 575-605, 2006.
- TYAGI, A. M.; SRIVASTAVA, K.; SHARAN, K.; YADAV, D.; MAURYA, R.; SINGH, D. Daidzein prevents the increase in CD4+CD28null T cells and B lymphopoiesis in ovariectomized mice: a key mechanism for anti-osteoclastogenic effect. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21216, 2011.
- VARG, I.; NESCAKOVA, E.; TOTH, F.; UHRINOVA, A.; ADAMKOV, M. Nutrition and immune system: the size of the thymus as an indicator of the newborn's nutrition status. **Anthropologischer Anzeiger**, v. 68, n. 3, p. 265-274, 2011.
- VIERECK, V.; GRUNDKER, C.; BLASCHKE, S.; SIGGELKOW, H.; EMONS, G.; HOFBAUER, L. C. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 84, n. 4, p. 725-735, 2002.
- VISSER, A.; THOMAS, A. Review: Soya protein products-their processing, functionality, and application aspects. **Food Reviews International**, v. 3, n. 1-2, p. 1-32, 1987.
- VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 38, n. 1, p. 1-11, 2012.
- VRACHNIS, N.; ZYGOURIS, D.; ILIODROMITI, Z.; DANIILIDIS, A.; VALSAMAKIS, G.; KALANTARIDOU, S. Probing the impact of sex steroids and menopause-related sex steroid deprivation on modulation of immune senescence. **Maturitas**, v. 78, n. 3, p. 174-178, 2014.
- WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M. S.; KRISHNAN, P. G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 3, p. 337-341, 1998.
- WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1666-1673, 1994.
- WANG, T. T.; SATHYAMOORTHY, N.; PHANG, J. M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 2, p. 271-275, 1996.

- WANG, W.; HIGUCHI, C. M.; ZHANG, R. Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the In Vitro potentiation of lymphocyte activation. **Nutrition and Cancer**, v. 29, n. 1, p. 29-34, 1997.
- WEBER, K. S.; SETCHELL, K. D.; STOCCO, D. M.; LEPHART, E. D. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 3, p. 591-599, 2001.
- WHITE, R.; LEES, J. A.; NEEDHAM, M.; HAM, J.; PARKER, M. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 1, n. 10, p. 735-744, 1987.
- WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 5-20, 2001. Supplement, 1.
- WHO. Research on the menopause in the 1990s - Introduction. **Research on the Menopause in the 1990s**: report of a WHO scientific group, v. 866, p. 1-107, 1996.
- WIDLANSKY, M. E.; GOKCE, N.; KEANEY, J. F., JR.; VITA, J. A. The clinical implications of endothelial dysfunction. **J Am Coll Cardiol**, v. 42, n. 7, p. 1149-1160, 2003.
- WILCZYNSKI, J. R. Modulation of immune functions by oestrogens. Part II. **Przegląd Menopauzalny**, v. 9, n. 3, p. 128-131, 2010a.
- WILCZYNSKI, J. R. Modulation of immune functions by oestrogens. Part I. **Przegląd Menopauzalny**, v. 9, n. 2, p. 59-62, 2010b.
- WOOD, C. E.; REGISTER, T. C.; FRANKE, A. A.; ANTHONY, M. S.; CLINE, J. M. Dietary soy isoflavones inhibit estrogen effects in the postmenopausal breast. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 1241-1249, 2006.
- YAMAGUCHI, M.; GAO-BALCH, Y. H. Role of Dietary Soybean Genistein in Osteoporosis Prevention. **International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics**, v. 2, n. 2, p. 1-11, 2013.
- YANAGISAWA, M.; SUGIYA, M.; IIJIMA, H.; NAKAGOME, I.; HIRONO, S.; TSUDA, T. Genistein and daidzein, typical soy isoflavones, inhibit TNF- α -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 56, n. 12, p. 1783-1793, 2012.
- YANG, H.; MOHAMED, A. S. S.; ZHOU, S. H. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p. 2-9, 2012.
- YELLAYI, S.; NAAZ, A.; SZEWCZYKOWSKI, M. A.; SATO, T.; WOODS, J. A.; CHANG, J.; SEGRE, M.; ALLRED, C. D.; HELFERICH, W. G.; COOKE, P. S. The

phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 99, n. 11, p. 7616-7621, 2002.

YELLAYI, S.; ZAKROCZYMSKI, M. A.; SELVARAJ, V.; VALLI, V. E.; GHANTA, V.; HELFERICH, W. G.; COOKE, P. S. The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 2, p. 267-274, 2003.

ZAI-QUN, L. Antioxidants may not always be beneficial to health. **Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 131-133, 2014.

ZHANG, R.; LI, Y.; WANG, W. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. **Nutrition and Cancer**, v. 29, n. 1, p. 24-28, 1997.

ZHANG, Y. B.; NA, X. L.; ZHANG, Y.; LI, L. N.; ZHAO, X. Y.; CUI, H. B. Isoflavone Reduces Body Weight by Decreasing Food Intake in Ovariectomized Rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 54, n. 3, p. 163-170, 2009.

ZHOU, J. R.; MUKHERJEE, P.; GUGGER, E. T.; TANAKA, T.; BLACKBURN, G. L.; CLINTON, S. K. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 58, n. 22, p. 5231-5238, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, p.577- 614.