UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos

AÇÃO DA SOJA SOBRE A TIREÓIDE DE RATOS
INFLUÊNCIA DO IODO DA RAÇÃO

TULLIA M. C. C. FILISETTI-COZZI

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. FRANCO M. LAJOLO

São Paulo
1984

A você, Carlos
pelo estímulo,
pela compreensão,
pela paciência,
etc,

SUMÁRIO

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MÉTODOS	6
2.1 - Fracionamento da Soja	6
2.1.1 - Obtenção da Farinha Desengordurada e Auto <u>cl</u> avada (FDA)	6
2.1.2 - Obtenção do Resíduo Extração com Água, Extra <u>to</u> Aquoso e Fração Acetônica	7
2.1.3 - Obtenção do Resíduo Metanol-Acetona	9
2.1.4 - Obtenção do Hidrolisado e Resíduo da Hi <u>dr</u> ólise	9
2.2 - Ensaios com Animais	10
2.2.1 - Ensaios agudos (Frações de baixo peso mo <u>le</u> cular)	10
2.2.2 - Ensaios com rações contendo iodo	13
2.2.3 - Ensaios usando rações com restrição de iodo	14
2.2.4 - Ensaios com produtos resultantes da hidr <u>o</u> lise enzimática	15
2.3 - Determinação da Porcentagem de Captação Relativa	15
2.4 - Dosagem dos Hormônios da Tireóide	15
2.4.1 - Preparo do hidrolisado	15
2.4.2 - Cromatografia dos hormônios marcados	16
2.4.3 - Medida da radioatividade dos hormônios ti <u>re</u> oídicos	17
2.5 - Dosagem dos Hormônios Séricos	17
2.6 - Métodos Histológicos e Histoquímicos	18
2.7 - Métodos Estatísticos	18
3 - MATERIAIS	19
3.1 - Soja	19

	pág.
3.2 - Animais	19
3.3 - Rações Experimentais	20
3.3.1 - Rações contendo iodo (Ensaio com a fração de baixo peso molecular)	20
3.3.2 - Rações com restrição de iodo (Ensaio com frações de baixo ou alto peso molecular) ..	20
3.4 - Iodo Radioativo	24
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 - Ensaio com Rações Contendo Iodo. Efeito da Fra- ção Acetônica	26
4.2 - Ensaio com Rações com Restrição de Iodo	30
4.2.1 - Efeito das frações de baixo peso molecu- lar	31
4.2.2 - Efeito das frações de alto peso molecular	34
4.3 - Exame Anatomopatológico da Tireóide	40
4.3.1 - Exame Macroscópico	41
4.3.2 - Exame Microscópico	41
4.4 - Efeito dos Produtos da Hidrólise Enzimática	45
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
RESUMO	58
SUMMARY	59

1 - INTRODUÇÃO

Substâncias que agem direta ou indiretamente na tireóide podem ser encontradas em inúmeros vegetais consumidos pelo homem⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁹⁾. A maioria delas é bem conhecida, tem estrutura química já definida e pertence ao grupo dos cianatos⁽²²⁾, tiocianatos, isotiocianatos, nitrilas, tiooxazolidonas⁽¹¹⁾, nitratos e nitritos⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁸⁾, dissulfetos⁽⁴⁹⁾ ou dos flavonóides⁽²³⁾⁽³⁶⁾⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁵²⁾.

Ao lado dessas substâncias bociogênicas conhecidas, existem outras, cuja natureza e ação não foram ainda bem caracterizadas, como é o caso do fator existente na soja⁽³²⁾.

A revisão da literatura mostra que os vários pesquisadores atribuem a causas diversas, os diferentes efeitos causados pela soja sobre a tireóide, sendo que alguns negam mesmo a existência de qualquer ação direta.

McCARRISON⁽³⁵⁾ foi o primeiro a descrever a ocorrência de um aumento no peso da tireóide em ratos alimentados com soja.

Estudos posteriores de outros autores demonstraram que esse efeito poderia ser revertido, parcialmente, por aquecimento da soja e, totalmente, pela ingestão de iodo em quantidades um pouco acima das necessárias⁽¹⁸⁾⁽⁵⁴⁾⁽⁶⁴⁾. Efeitos semelhantes, medidos porém pela redução na captação de iodo radioativo, foram observados tanto em ratos⁽²⁸⁾ como em crianças alérgicas⁽⁶³⁾ ali-

Ao Prof. Franco M. Lajolo, pela orientação e interesse com que acompanhou nossos trabalhos; à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudos durante os anos de 1978 e 1979; à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento da pesquisa; à Comissão Nacional de Energia Nuclear - CENEN São Paulo pelo fornecimento do material radioativo; à Escola Superior de Agronomia de Lavras, Instituto Agronômico de Cam^{pi}nas - Seção Leguminosas, Cooperativa Mogiana de Óleos Vegetais - COMOV pelo fornecimento das amostras de soja; à Central de Radioimunoensaio de São Paulo, à colega Célia Colli e ao Prof. José Carlos Barberio, pelo auxílio técnico nos testes de radioimunoensaio; à Profa. Silvia Berlanga de Moraes Barros e ao Prof. Helio Bisi pelo auxílio técnico e na interpretação dos resultados nos ensaios anatomopatologicos; aos colegas Ursula M. Lanfer Marquez, Maria Oriana Reyes Figueroa, Alfredo Tenuta Filho, Elisabeth Garcia, Flávio Finardi Filho, Elizabete Wenzel de Menezes e Celly Akemi Donomai pelos auxílios técnicos prestados nos momentos mais críticos, à Loanda d'Eurydice pela compreensão e eficiente execução da datilografia; à bibliotecária Maria Amélia Rocha Costa do Conjunto das Químicas da USP, pela revisão e normalização das referências bibliográficas; aos demais colegas e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP que sempre, de alguma forma, colaboraram como conosco.

E aos nossos pais e amigos pelo apoio, coragem e confiança que sempre nos transmitiram

nossos agradecimentos

mentadas com leite de soja.

Por outro lado, opostamente, outros autores observaram um aumento na captação de iodo marcado, tanto em ratos⁽³⁾⁽⁶¹⁾ como em crianças alimentadas com produtos derivados de soja⁽¹⁹⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁵⁵⁾. Esses efeitos foram atribuídos a uma ação indireta: haveria um aumento na excreção fecal de tiroxina endôgena reduzindo consequentemente a sua possibilidade de recuperação pela circulação entero-hepática.

Outra linha de observações é trazida pelas pesquisas de NORDSIEK⁽⁴²⁾ que verificou haver um aumento do peso da tireóide, em ratos alimentados com rações contendo de 35 a 60% de soja crua observando, porém, que a adição de caseína, uma proteína nutricionalmente melhor, à ração, eliminava aquele efeito.

Nesse caso o efeito bociogênico poderia estar relacionado, pelo menos em parte, com a baixa digestibilidade da proteína de soja crua.

Os resultados apresentados por vários autores, em muitos casos, são difíceis de serem comparados, pelo fato de que a soja não processada termicamente, tem fatores anti-nutricionais que podem interferir com o crescimento normal e, portanto, com a fisiologia da tireóide⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾⁽⁶⁶⁾.

Igualmente ao que se observa para o efeito biológico, muito pouco tem sido estabelecido sobre as propriedades químicas do possível fator. Alguns autores concluíram que ele pode ser precipitado com éter, clorofórmio, acetona e etanol⁽¹⁸⁾⁽⁶⁴⁾, ao passo que outros observaram uma solubilidade parcial em éter e acetona⁽⁵⁴⁾.

Trabalhos mais recentes constataram a presença de um

agente tireoideano na farinha de soja desengordurada não aquecida⁽²⁸⁾, que resiste à digestão pancreática e ao aquecimento em banho-maria fervente, mas é, aparentemente, destruído pelo tostamento da farinha e, quando incorporado a dieta, aumenta a capacidade de ligação ~~das proteínas séricas~~ ^{às proteínas séricas.} à triiodotironina (T_3) exógena radioativa. A glândula quando exposta "in vitro"⁽²⁹⁾ a esse agente depressor da captação de I^{131} , apresenta uma incorporação menor de radioiodo na forma de diiodotirosina (DIT) e um aumento da relação triiodotironina/tiroxina (T_3/T_4) radioativos.

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que extratos obtidos de produtos comerciais processados de soja⁽¹⁴⁾, foram capazes de diminuir a captação de I^{131} pela tireóide, em ensaios de 24h de duração.

Em estudos posteriores⁽¹²⁾ confirmamos que, de fato, havia na soja um fator resistente à autoclavagem por 1h a $121^{\circ}C$, capaz de reduzir a captação de iodo desde 6h até 24h após a sua ingestão.

Ainda, em outro trabalho subsequente⁽¹³⁾, conduzimos estudos por tempos mais longos (16 e 29 dias) com frações de soja crua ou autoclavada; e verificamos que a ingestão por 16 dias de farinha crua causou aumento de 40% no peso da tireóide, redução semelhante na porcentagem de captação de I^{131} e um aumento na capacidade sérica de ligação da triiodotironina radioativa exógena. Porém, a fração após a autoclavagem, provocou uma redução na capacidade sérica do T_3 nos ensaios de 16 dias e nos de 29 dias, observamos uma diminuição no peso da tireóide e um aumento na % de captação.

Nos ensaios de 29 dias essa mesma fração provocou também uma alteração dos hormônios tireoideanos

representada por um aumento da velocidade de síntese de T_3 e T_4 respectivamente redução da relação T_3/T_4 e um aumento da relação MIT/DIT.

Porém, problemas de crescimento devidos à presença de fatores anti-nutricionais na soja crua e a existência de iodo em excesso nas rações utilizadas dificultaram uma interpretação aceitável do mecanismo de ação.

Nessa mesma linha de trabalho, que estamos desenvolvendo, conseguimos compilar da literatura os estudos de SUWA e KIMURA⁽⁵⁷⁾. Esses autores detectaram ação bociogênica em produtos de soja em condições de baixa ingestão de iodo, que foi atribuída a uma fração extraída com metanol a 90%, solúvel em acetona e butanol e insolúvel em éter etílico. Pelo menos um dos compostos ativos foi identificado como sendo uma saponina.

Pouco se sabe ainda sobre o significado biológico a longo prazo dessa ação da soja. KIMURA e cols.⁽²⁶⁾ porém, alertaram para observações que fizeram, de que ratas submetidas a rações de soja e, em condições de deficiência em iodo, apresentavam sinais de tumores malignos na tireóide.

Recentemente somam-se ainda as observações de KIMURA⁽²⁴⁾ e KIMURA e cols.⁽²⁵⁾ que também detectaram ação bociogênica em produtos de soja produzidos no Japão.

Pelo descrito acima verificamos a importância do estudo desse "fator" presente na soja, uma vez que ela vem sendo introduzida cada vez mais na formulação de alimentos destinados a programas oficiais de alimentação de grupos vulneráveis fornecidos, inclusive, a crianças desnutridas. Além disso, ela vem sendo utilizada pela indústria alimentícia na produção de diversos

alimentos, com finalidade variada: dietéticas ou tecnológicas. Assim sendo esse "fator" poderá atuar em indivíduos em estados nutricionais ou de saúde os mais variados possíveis e, como consequência poderá induzir alterações na tireóide de significados distintos, conforme o caso.

O presente trabalho tem por objetivo, estudar a ação na tireóide de ratos, de algumas frações de baixo e alto peso molecular, obtidas da farinha de soja desengordurada e autoclavada, quando fornecidos em rações com e sem iodo, na tentativa de obter informações sobre sua natureza, mecanismo de ação e, consequentemente, inferir sobre o seu significado biológico.

2 - MÉTODOS

2.1 - Fracionamento da Soja

Da soja integral obteve-se, inicialmente, a Farinha Desengordurada e Autoclavada (FDA); esta foi, a seguir, tratada de diversas formas para a preparação de duas grandes frações que foram denominadas de "fração de baixo peso molecular" e "fração de alto peso molecular". A fração de baixo peso molecular compreende duas sub-frações: Extrato Aquoso e Fração Acetônica. A de alto peso molecular compreendeu: a FDA, Resíduo de Extração com Água e Resíduo da Extração com Metanol e Acetona.

2.1.1 - Obtenção da Farinha Desengordurada e Autoclavada (FDA)

A soja foi moída em moinho de facas com peneira de diâmetro 0,127 cm e, em seguida, desengordurada com éter etílico durante 20 horas, em aparelho de Soxhlet. O solvente residual da farinha foi removido em capela, sob ventilação, e o material moído novamente, nas mesmas condições.

A farinha desengordurada obtida foi misturada com água destilada na proporção de 10:75 (soja:água) e autoclavada durante 30 minutos a 121°C. Porções de 100 gramas de farinha foram adicionadas a 750 ml de água destilada e autoclavadas em recipientes

de aço inoxidável de dois litros e meio . Após secagem em estufa a 55°C com circulação de ar, por 8 horas, o material foi novamente moído. Na farinha resultante (FDA) avaliou-se o teor de umidade⁽⁴³⁾ proteínas⁽²⁾ e fibra⁽⁶²⁾ obtendo-se, respectivamente, os seguintes valores: 5,3%, 49,8% (Nx5,71) e 9,2%.

2.1.2 - Obtenção do Resíduo da Extração com Água, Extrato Aquoso e Fração Acetônica (Figura 1)

Após tratamento térmico em autoclave a suspensão em água da FDA foi acidificada com HCl 1N até pH 4,2 (ponto isoelétrico da proteína de soja), submetida a agitação por uma hora a temperatura ambiente e a seguir centrifugada a 7000 r.p.m. durante 20 minutos. O resíduo foi reextraído com 250 ml de água destilada nas mesmas condições.

O resíduo final resultante deu origem ao Resíduo de Extração com Água, após secagem em estufa com circulação de ar a 55°C por 10 horas e posterior moagem. A determinação do teor de umidade⁽⁴³⁾, proteína⁽²⁾ e fibra⁽⁶²⁾ foi respectivamente de: 7,1%, 57,7% (Nx5,71) e 13,4%.

Os sobrenadantes resultantes desse tratamento foram : a) concentrados em evaporador rotatório à vácuo em b.m. a 50°C até volume de 50 ml (para 100g de FDA), resultando o Extrato Aquoso, ou b) foram submetidos a tratamento com acetona na proporção de 2:1 (acetona:sobrenadante) e deixadas em repouso por 10 horas a 4°C. Após filtração o filtrado foi concentrado a vácuo em b.m. a 50°C até volume de 50 ml (para 100g de FDA) originando a Fração Acetônica⁽²⁸⁾.

FIGURA 1 - Esquema Geral de fracionamento da farinha desengordurada e autoclavada. As frações enquadradas foram aquelas ensaiadas experimentalmente.

2.1.3 - Obtenção do Resíduo Metanol-Acetona

O resíduo da Extração com Água foi tratado com metanol a 90% em extrator de Soxhlet durante 24 hs e após secagem em capela com ventilação, foi submetido a uma segunda extração, agora com acetona durante mais 24 hs. O material final, após seco por ventilação apresentava ainda traços de solventes, sendo necessário hidratá-lo para posterior secagem; esta foi conduzida em estufa a 55°C por mais 8 horas. O produto assim obtido foi chamado de Resíduo Metanol-Acetona (Figura 1).

Os teores de Umidade⁽⁴³⁾, proteína⁽²⁾, cinza⁽⁴³⁾ e fibra total e solúvel pelo método enzimático⁽¹⁾ (descontando-se a proteína e cinza) foram respectivamente de: 7,9%, 60,2%, 1,9%, 30,3% e 6,12%.

2.1.4 - Obtenção do Hidrolisado e Resíduo da Hidrólise

O Resíduo Metanol-Acetona (1177g) foi misturado com água destilada a 50°C na proporção de 1:10 (Resíduo Metanol-Acetona:Água) resultando uma concentração final de substrato (proteína) de 5,6%. A mistura resultante foi acidificada com HCl 4M até atingir o pH de 1,7 e submetida à hidrólise enzimática com pepsina (Biobras-3000NF) na proporção de 2:100 (enzima:proteína) a 50°C em câmara quente durante duas horas, com agitação.

Terminada a primeira hidrólise o pH foi elevado para 8,0 com auxílio de NaOH 4M submetendo-se a mistura a uma segunda hidrólise com pancreatina (Sigma P-1750) na proporção de 2:100

(enzima:proteína) por 18 horas a 45°C. Durante as duas primeiras horas o pH da mistura foi mantido constante em torno de 8,0 com auxílio de um pipetador automático acoplado a um potenciômetro, para evitar a acidificação brusca nas primeiras horas. Finda a hidrólise as enzimas foram inativadas em b.m. fervente por 10 minutos. Após esfriamento em banho de gelo o pH foi corrigido para 7,0 com HCl 4M, a suspensão centrifugada a 8.000 r.p.m. durante uma hora e o centrifugado foi filtrado em funil de Büchner à vácuo. O resíduo resultante foi reextraído, com três litros de água destilada, durante uma hora, com agitação, e submetido ao mesmo tratamento citado acima, sendo finalmente secado em estufa com circulação de ar a 55°C durante 10 horas e moído, constituindo-se no Resíduo da Hidrólise (Figura 1). Os sobrenadantes foram concentrados à vácuo em b.m. a 50°C obtendo-se assim o Hidrolisado (Figura 1).

Os teores de umidade⁽⁴³⁾, proteína⁽²⁾, cinza⁽⁴³⁾ e extrato etéreo⁽⁴³⁾ do Hidrolisado foram respectivamente: 70,9%; 19,9% (Nx5,71); 4,08% e 0,41% e os do Resíduo da Hidrólise foram: 9,0%; 35,7% (sendo 12,5% não biodisponível); 5,4% e 0,84%. O teor de fibra total (método enzimático)⁽¹⁾ do Resíduo da Hidrólise foi equivalente a 43,7% já descontada a cinza e a proteína não digerida. Para evitar a deterioração da mistura durante a hidrólise adicionou-se timolã suspensão numa concentração final de 0,05%.

2.2 - Ensaaios com animais

2.2.1 - Ensaaios "agudos" (Frações de baixo peso molecular)

As frações de baixo peso molecular, antes dos ensaios crônicos, foram sempre submetidas a ensaios agudos para confirma -

ção da sua atividade sobre a tireóide.

Esses ensaios agudos foram realizados por duas metodologias: a) "in vivo", em experiências de 24h ou b) "in vitro". No primeiro caso o material foi dado por sonda gástrica e a captação do I^{131} avaliada após 24hs com já descrito em trabalho anterior⁽¹²⁾. No segundo caso "in vitro", o ensaio foi conduzido usando-se a tireóide isolada de ratos previamente submetidos, por 15 dias, a dieta sem iodo (dieta de caseína padrão sem iodo na ração ~~ou~~ na água de beber, conforme ³2.3.1).

O método "in vitro" mostrou ser mais interessante do que o anteriormente utilizado "in vivo"⁽¹²⁾ sob vários aspectos: sensibilidade, diminuição do tempo de resposta da glândula, redução da quantidade de material a ser testado, diminuição do número de animais em cada ensaio e eliminação de interferência de outros compostos anti-nutricionais que poderiam mascarar o efeito.

Antes de sua introdução em nossos ensaios realizamos um estudo do efeito em função da dose para avaliarmos sua validade, que foi conduzido como descrito abaixo.

Animais em depleção de iodo foram decapitados com guilhotina tomando-se o cuidado para não atingir a tireóide. A glândula foi extraída com auxílio de uma lupa e cada lóbulo colocado em um erlenmeyer de 25 ml contendo: 4,5 ml de solução Krebs-Ringer-Fosfato⁽²⁰⁾ gaseificada com 95% de O_2 e 5% CO_2 por meia hora e 0,3 ml de água destilada contendo 30 μCi de $I-131$. Para avaliar o efeito da dose foram adicionados ao meio de incubação 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 ml da Fração Acetônica. Cada ponto foi testado em dois animais utilizando-se um lóbulo do mesmo animal como controle e o outro como experimental.

Logo em seguida os frascos foram hermêticamente fechados e levados a b.m. com agitação a 39°C durante 3h. Terminado o período, as tireóides foram lavadas com o meio de incubação e a radioatividade medida, calculando-se, em seguida, a % de captação relativa (item 2.3 a).

FIGURA 2 - Efeito da concentração do Extrato Acetônico na captação de I-131 pela tireóide

Pela Figura 2 verificamos que existe uma relação inversa não linear entre a concentração da Fração Acetônica e a captação relativa de I-131 pela tireóide.

A validade do método foi confirmada, também, através da análise de frações que já se mostraram ativas quando testadas nos

ensaios de 24hs "in vivo"(12).

No caso específico da Fração Acetônica verificamos em média uma diminuição na % de captação em relação aos seus respectivos controles de 53% nos ensaios "in vitro" e de 31% nos ensaios "in vivo".

2.2.2 - Ensaios com rações contendo iodo

Foram conduzidos para se verificar a ação da Fração Acetônica, de baixo peso molecular, em períodos de 7, 18 e 57 dias. A atividade da fração foi previamente avaliada como descrito acima.

Após os períodos experimentais, os animais receberam I-131 por via intraperitoneal nas doses de 10 μ Ci/100g de rato (nos ensaios de 7 dias) e de 5 μ Ci/100g de rato nos ensaios de 18 e 57 dias. Transcorridas 24 horas os animais foram anestesiados com éter e o sangue retirado por punção cardíaca.

As tireóides e os demais órgãos foram removidos e logo em seguida pesados em balança analítica. A ação da Fração Acetônica foi determinada através do crescimento, consumo de ração, coeficiente de eficácia alimentar (ganho de peso/ração ingerida) peso relativo dos órgãos, % de captação relativa e em alguns casos, quando mostrava-se necessário, avaliou-se a distribuição dos hormônios séricos e na tireóide.

2.2.3 - Ensaios usando rações com restrição de iodo

Esses ensaios foram conduzidos por tempos de 10, 14, 24 e 84 dias para estudar a ação das frações de baixo e alto peso molecular. A ação das primeiras foi, a exemplo do caso anterior, verificada através de ensaios agudos para se ter certeza da sua atividade.

Os animais utilizados nessas experiências foram submetidos à dieta de glúten sem iodo (e água deionizada) por dez dias para depleção e nivelamento das reservas do mineral (ver item 3.3.2).

Após os períodos experimentais os animais receberam I-131 por via intraperitoneal, sendo que nos ensaios de 10, 14 e 24 dias em doses de 10 μ Ci/100g de ratos e nos de 84 dias, de 5 μ Ci/100g. Após 24 horas os animais eram anestesiados com éter etílico, o sangue era removido por punção cardíaca e, após o sacrifício, as tireóides eram dissecadas, lavadas com solução fisiológica e pesadas, como os demais órgãos retirados. Nos ensaios de 84 dias logo em seguida à pesagem um dos lóbulos da tireóide de cada rato foi imerso em 1 ml líquido de Bouin⁽³⁸⁾ contido em tubo de ensaio de fundo chato para posterior medida de radioatividade e tratamento histológico e histoquímico. A ação das diversas frações era determinada através dos parâmetros já descritos e do exame anatomicopatológico da tireóide.

2.2.4 - Ensaio com os produtos resultantes da hidrólise enzimática

Foram conduzidos basicamente como descrito para os casos anteriores. O tempo da experiência foi de 19 dias e a dose de I^{131} de 5 $\mu\text{Ci}/100\text{g}$ de animal.

2.3 - Determinação da porcentagem de captação relativa

Os resultados da captação de iodo foram expressos, conforme a experiência, como descrito abaixo:

a) ensaios "in vitro"

$$\% \text{ de captação relativa} = \frac{\text{contagens do lóbulo experimental}}{\text{contagens do lóbulo controle}} \times 100$$

b) ensaios "in vivo"

$$\% \text{ de captação relativa} = \frac{\text{contagens da tireóide}}{\text{contagens injetadas} \times \text{peso tireóide(mg)}} \times 1000$$

2.4 - Dosagem dos Hormônios da Tireóide

2.4.1 - Preparo do hidrolisado

Logo após a medida da radioatividade, cada tireóide foi homogeneizada conforme metodologia já descrita por KONIUN e col.⁽²⁹⁾ e adaptada por nós, da seguinte forma: a tireóide foi homogeneiza

da com o auxílio de um homogeneizador mecânico (tipo Potter-Elvehjem) com 1 ml de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,6 contendo 0,1% de tiouracil; 0,9% de NaCl e 0,3% de protease (Sigma P-5005); após a homogeneização acrescentaram-se mais 2 ml de protease a 0,3 % (Sigma P-5005) dissolvida no mesmo tampão.

Finda a hidrólise enzimática em b.m. a 37°C por 24h o hidrolisado de cada glândula foi centrifugado a 6000 r.p.m. por 30 min e o sobrenadante utilizado para cromatografia em camada delgada.

2.4.2 - Cromatografia dos hormônios marcados

A separação dos hormônios e seus precursores foi realizada por cromatografia ascendente em camada delgada de sílica gel G de 0,25 mm de espessura em placas de vidro (Poligram Sil G-MA - CHEREY-NAGEL)⁽⁵³⁾.

O cromatograma de cada hidrolisado foi desenvolvido em dois sistemas de solventes distintos a 25°C em uma cuba de vidro (CAMAG 10cm X 25cm) sem saturação prévia..

O primeiro sistema era composto de álcool amílico terciário: acetona: NH₄OH (25:8:7) e o 2º sistema de álcool amílico terciário: acetona:0,1% de tiosulfato de sódio diluído em NH₄OH 2N (25:8:7). Antes da aplicação das amostras sobre as placas 800 µl do hidrolisado de cada glândula foram misturadas com 200 µl de uma mistura de padrões frios (2 mg de NaI + 4 mg de MIT + 4 mg DIT + 8 mg de T₃ e 8 mg de T₄ dissolvidos em 4 ml de uma mistura 1:1 de NH₄ OH 2N e etanol)*.

80 µl dessa mistura foram então aplicadas nas placas com

* MIT = moniodotirosina; DIT = diiodotirosina; T₃ = triiodotironina; T₄ = tiroxina.

auxílio de uma micropipeta de 10 μ l.

O cromatograma foi desenvolvido no 1º sistema de solventes durante 18 horas e, após a secagem em capela com ventilação, colocado no 2º sistema, sendo a corrida interrompida logo após o solvente ter atingido a extremidade superior da placa (aproximadamente 6 horas). Finda a corrida, os cromatogramas foram secados e revelados quimicamente. Para os compostos com grupamentos fenólicos utilizou-se o reativo de Pauly⁽²¹⁾.

2.4.3 - Medida da radioatividade dos hormônios tireoidianos

Após revelação química, os cromatogramas foram secados em estufa a 37°C e as manchas correspondentes a cada hormônio e seus precursores retirados da placa por raspagem; o material correspondente foi colocado em tubo de ensaio de fundo chato, para posterior contagem. Os hormônios radioativos e seus precursores foram expressos em porcentagem, relacionando-se as contagens dos 80 μ l aplicados no cromatograma com aquelas correspondentes a cada um dos hormônios (T_3 e T_4) e seus precursores (MIT e DIT).

2.5 - Dosagem dos Hormônios Séricos

Antes da remoção das tireóides os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue foi retirado por punção cardíaca.

ca. Após coagulação, o soro foi separado por centrifugação a 2000 r.p.m., durante 20 minutos, e congelado a -20°C para posterior análise. A quantificação dos hormônios foi feita por radioimunoensaio avaliando-se T_3 e T_4 totais segundo metodologia já descrita⁽⁷⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾.

2.6 - Métodos Histológicos e Histoquímicos

Nos ensaios de 84 dias as tireóides foram submetidas a exames histológicos. Um dos lóbulos da tireóide de cada animal, foi fixada em líquido de Bouin⁽³⁸⁾, incluído em parafina e submetido a cortes de 5 micra de espessura em micrótomo rotatório American Optical, modelo "820". Os cortes foram submetidos a duas técnicas de coloração: hematoxilina-eosina (HE)⁽⁴⁴⁾ e ácido periódico-base de Shiff⁽³⁴⁾₍₁₉₅₎⁽³⁴⁾; esta última foi utilizada para identificar o colóide (glicoproteína) existente no interior de cada folículo.

2.7 - Métodos Estatísticos

Empregou-se basicamente o teste "t" de Student para comparação entre duas médias⁽⁴⁰⁾.

3 - MATERIAIS

3.1 - Soja

Utilizamos o cultivar Sta. Rosa (Glycine max.) obtido da Estação Experimental da Escola Superior de Agronomia de Lavras, do Instituto Agronômico de Campinas ou da Cooperativa Mogiana de Óleo Vegetais (COMOV).

3.2 - Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (Rattus norvegicus var. albinus) obtidos de colônias mantidas no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e alimentados com ração comercial padrão do biotério. Durante os experimentos foram alojados em gaiolas individuais, recebendo água "ad-libitum" e os diferentes tipos de rações experimentais, em pó. 7 a 8 animais foram utilizados em cada experimento e provinham de ninhadas com mesma idade.

3.3 - Rações Experimentais

3.3.1 - Rações contendo iodo (Ensaio com a fração de baixo peso molecular)

Os animais dos Grupos Controle e Fração Acetônica receberam como fonte proteica caseína a 18%.

A Fração Acetônica foi incorporada à ração de caseína na proporção de 20 ml ou 60 ml/100g conforme o caso.

Os demais ingredientes: mistura vitamínica, mistura salina, celulose microcristalina (Avicel PH 101) e óleo de milho entraram na proporção mostrada na Tabela 1. A mistura salina foi formulada segundo FOX e BRIGGS⁽¹⁵⁾ sem a presença de iodeto de potássio, sendo o iodo fornecido através da água de beber, na concentração de 28 µgI/100 ml de água, quantidade mínima necessária para o desenvolvimento normal do animal⁽⁹⁾. A mistura vitamínica já descrita anteriormente⁽³⁰⁾ sofreu algumas alterações passando a conter, por quilo: acetato de vitamina A = 0,172g (500.000 UI) ; vitamina D₂ (calciferol) = 150.000 UI; vitamina K₃ = 0,02g; ácido para-aminobenzóico = 0,1g; ácido L-ascórbico = 1,0g e inositol = 1g.

3.3.2 - Rações com restrição de iodo (Ensaio com frações de baixo ou alto peso molecular)

Os animais dos Grupos Controle, Fração Acetônica e Extrato Aquoso receberam, como fonte proteica, glúten. A Fração Acetônica e o Extrato Aquoso foram incorporados à ração de glúten na proporção de 20 ml por 100g (Tabela 2). Os demais produtos de fracionamento da soja: Farinha Desengordurada e Autoclavada, Resíduo da Extração com Água, Resíduo Metanol-Acetona, Hidrolisado e Resíduo da Hidrólise foram incorporados de forma a se obter uma concentra-

ção final próxima de 18% de proteína.

As rações preparadas exclusivamente com proteína de soja foram suplementadas com DL-metionina (0,2% na ração) e as de glúten com L-lisina (0,6% na ração) (Tabela 2).

Os outros componentes da ração: mistura vitamínica (item 2.3.1), mistura salina⁽¹⁵⁾ e óleo de milho foram os mesmos da ração com iodo e acrescentadas nas concentrações de 1,4 e 8% respectivamente. Nesse caso a água de beber, além da mistura salina, não continha iodo, sendo destilada e deionizada.

A quantidade de celulose acrescentada às rações estava na dependência da quantidade de fibra préexistente na soja, perfazendo uma concentração final de 5%; apenas no caso dos produtos da hidrólise a concentração final foi diferente (7,8%).

Dez dias antes do início das experiências de 10, 14 e 24 dias de duração, os animais foram alimentados com dieta Controle de Glúten (18% de proteína).

Nesse caso, também, tanto a água de beber (deionizada) bem como a mistura salina não continham iodo, para permitir um nivelamento inicial das reservas de iodo na tireóide.

As rações experimentais de todos os grupos com e sem iodo eram acrescidas de amido de milho em uma quantidade suficiente para perfazer um total final de 100 gramas.

O teor final de proteína foi obtido por análise⁽²⁾, verificando-se que todas as rações estavam dentro dos limites esperados de $18\% \pm 0,8$. Os fatores de conversão utilizados para a caseína, soja e glúten foram respectivamente de 6,25; 5,71 e 5,70.

TABELA 1 - Composição básica das rações contendo iodo

Ingredientes %	Grupos	
	Caseína (Controle)	Fração Acetônica
Caseína	18	18
Avicel PH 101	8	8
Fração Acetônica ¹	—	20 ² ou 60 ³
Mistura Vitamínica	1	1
Mistura Salina	4	4
Óleo de Milho	8	8
Amido de Milho ⁴	q.s.p. 100	

¹Expressa em ml/100g de ração

²Quantidade equivalente a ingestão de 2g de FDA/10g de ração

³Quantidade equivalente a ingestão de 6g de FDA/10g de ração

⁴Sem considerar o peso da Fração Acetônica

TABELA 2 - Composição básica das rações com restrição em iodo¹

Ingredientes (%)	G r u p o s							
	Glúten (Controle)	FDA ²	Fração Acetônica	Extrato Aquoso	Resíduo Extração c/Água	Resíduo Metanol Acetona	Hidrolí- sado	Resíduo da Hi- drólise
Glúten	18	—	18	18	—	—	—	13,8
Proteína de Soja	—	18	—	—	18	18	18	4,2
Extrato Aquoso ³	—	—	—	20	—	—	—	—
Fração Acetônica ³	—	—	20	—	—	—	—	—
Avicel PH 101	5	2,5	5	5	2,5	2,5	7,8	—
L-Lisina	0,6	—	0,6	0,6	—	—	—	0,6
DL-Metionina	—	0,2	—	—	0,2	0,2	0,2	—

¹ A mistura salina, mistura vitamínica e óleo de milho foram incluídos na % de 4, 1 e 8, e o amido de milho na quantidade suficiente para completar 100, sem considerar o peso do Extrato Aquoso e Fração Acetônica.

² Farinha Desengordurada e Autoclavada.

³ Expressa em ml/100g de ração.

3.4 - Iodo radioativo

Utilizou-se iodeto de sódio (Na^{131}I) produzido pelos laboratórios da Divisão de Radioisótopos da Comissão Nacional de Energia Nuclear - São Paulo, isento de carregador, dissolvido em solução fisiológica.

As contagens foram efetuadas num detetor de cintilação com cristal de poço de iodeto de sódio ativado com tâlio NaI(Tl) e contador modelo Ultra Scaler (Nuclear Chicago).

O glúten e a caseína foram obtidas no comércio local e tinham respectivamente 71,1 e 81,0% de proteína. Todos os outros reagentes usados foram de grau PA, Merck ou Sigma.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura tem mostrado que existe divergência em relação à magnitude da ação da soja crua ou de seus produtos sobre a tireóide de humanos ou animais. Essa divergência, que dificulta a interpretação do significado biológico da ação da soja, é acentuada pelas variações dos tempos experimentais utilizados pelos autores, pelos tipos de produtos e, principalmente, pelos diferentes teores de iodo nas rações experimentais testadas.

SHARPLESS e col.⁽⁵⁴⁾, WILGUS e col.⁽⁶⁴⁾ e HALVERSON e col.⁽¹⁸⁾ demonstraram, em ratos e galinhas, que a inclusão de soja não processada na ração, era capaz de provocar um aumento da tireóide e que essa propriedade era inibida, totalmente, pela administração de quantidades elevadas de iodo, ou parcialmente, pelo tratamento térmico.

Estudos posteriores⁽⁴⁾ em ratos alimentados com farinha de soja crua ou processada, proteína isolada e leite de soja, parecem confirmar essas observações: a adição de 160 µg de I/100 g de ração foi suficiente para a glândula voltar ao seu peso normal.

Alguns autores⁽¹⁹⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁵⁵⁾⁽⁶³⁾ observaram, em crianças alimentadas com leite de soja, não suplementado com iodo, a formação de bócio. Por outro lado, McCARRISON⁽³⁵⁾ observou que teores de iodo bem superiores ao necessário (1,5 mg I/dia) não

eram suficientes para curar a hiperplasia provocada pela soja. Contudo é oportuno comentar que o bôcio tratado com excessivas quantidades de iodo pode causar tireotoxicosis⁽⁴¹⁾.

Segundo SUWA e col.⁽⁵⁸⁾ a adição 20 μg I/10g na ração não foram suficientes para curar o bôcio desencadeado por derivados de soja (queijo de soja), porém, essa quantidade foi suficiente para reverter o bôcio causado por dietas pobres em iodo. „

Em trabalho anterior⁽¹²⁾ conseguimos isolar parcialmente um fator ativo em ensaios de 24h. Esse fator foi no presente trabalho estudado, não apenas em ensaios agudos mas em rações, por tempos mais longos, e em condições de restrição ou não de iodo na ração.

4.1 - Ensaios com Rações Contendo Iodo. Efeito da Fração Acetônica

Os teores aproximados de iodo presentes nas rações que utilizamos em nossos ensaios foram de 4,3 μg I/10g de ração, próximos daqueles considerados ótimos para o desenvolvimento normal do rato (2,8 μg I/10g ração)⁽⁹⁾. A caseína fornecia em torno de 0,67 μg de I/10g de ração e a água de beber 3,61 μg I/13g de água (a cada 10g de ração o animal ingere aproximadamente 13g de água).

Ainda a duração dos ensaios foi variável, uma vez que o fator tempo poderia influir nas respostas da glândula frente a um determinado estímulo.

A fração (Fração Acetônica) estudada nesse caso foi parcialmente purificada ^{2.42} (3.1.2 e Figura 1) e composta por produtos de baixo peso molecular, já que boa parte das proteínas (inclusi-

ve fitohemaglutininas e antitripsina) foram eliminadas pelo aquecimento, pela precipitação isoelétrica em pH 4,2 e numa, segunda fase, pelo tratamento com acetona(32)(37). Essa fração mostrou-se ativa em ensaios de 24hs e composta principalmente de peptídeos, glícides e flavonóides(12).

É importante lembrar que ela foi obtida a partir de soja autoclavada por 30 minutos e que a sua atividade se mantinha mesmo após autoclavagem a 121°C por 1h.

A experiência foi conduzida por 7, 18 e 57 dias não se verificando diferenças significativas nos índices de crescimento e coeficiente de eficácia alimentar (CEA).

Apenas os pesos relativos do ~~fígado~~ rim determinados nos ensaios de 7 dias (concentração tripla da Fração Acetônica) e 57 dias, sofreram um aumento significativo respectivamente de 15,9% e 13,1% (Tabela 3).

Com relação aos parâmetros da tireóide, na experiência de 7 dias de duração, só observamos diferença significativa para o T_4 sérico do grupo Fração Acetônica ($3,34 \pm 0,51$ contra $4,00 \pm 0,52$ $\mu\text{g/dl}$ para o controle). Por outro lado para tempos mais longos (18 dias) o T_4 sérico não mostrou mais diferença, o mesmo acontecendo aos 57 dias. Verificou-se, porém, uma diminuição na porcentagem de captação relativa, na relação T_3/T_4 e um aumento da % MIT e da relação MIT/DIT (Tabela 4). Nas experiências de 57 dias as únicas alterações observadas foram aumento da % DIT e diminuição de T_3 .

Os efeitos observados a nível glândular e sérico não foram suficientes para desencadear um aumento no peso da glândula e mesmo após um período de 57 dias verificamos que o comportamen

TABELA 3 - Efeito da fração acetônica sobre o crescimento e peso de órgãos. Rações contendo iodo^{1,2}

Grupos	Dias	Peso rato (g)		Ração ingerida (g)	Peso/100g rato		
		Inicial	Final		Tireoide mg	Fígado g	Rim g
Caseína	7	61,4 ± 5,5	106,2 ± 10,0 ^a	92,3 ± 6,7 ^a	10,97 ± 2,57 ^a	ND ³	ND
Fração Acetônica (20 ml/g/100g)	7	61,6 ± 4,6	103,8 ± 8,1 ^a	92,5 ± 6,7 ^a	9,63 ± 1,14 ^a	ND	ND
Caseína	7	65,9 ± 3,8	108,9 ± 7,8 ^a	106,1 ± 4,7 ^a	10,29 ± 1,51 ^a	4,54 ± 0,33 ^a	0,88 ± 0,05 ^a
Fração Acetônica (60 ml/100g)	7	65,1 ± 4,7	107,2 ± 6,0 ^a	109,5 ± 7,3 ^a	9,10 ± 1,10 ^a	4,92 ± 0,66 ^a	1,02 ± 0,06 ^b
Caseína	18	84,6 ± 7,0	182,6 ± 12,2 ^a	314,8 ± 16,4 ^a	5,14 ± 0,99 ^a	ND	ND
Fração Acetônica	18	84,0 ± 6,8	178,2 ± 10,3 ^a	313,4 ± 16,7 ^a	6,06 ± 1,15 ^a	ND	ND
Caseína	57	36,1 ± 1,4	237,1 ± 15,0 ^a	634,1 ± 37,0 ^a	10,95 ± 2,39 ^a	3,27 ± 0,36 ^a	0,61 ± 0,03 ^a
Fração Acetônica	57	36,4 ± 1,4	242,4 ± 13,1 ^a	669,7 ± 42,2 ^a	11,12 ± 1,97 ^a	3,15 ± 0,26 ^a	0,69 ± 0,05 ^b

¹ Média e Desvio Padrão

² Letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05)

³ Não determinado

TABELA 4 - Efeito da fração acetônica sobre a tireóide. Rações contendo iodo^{1,2}.

Grupos	Dias	% captação relativa	% MIT	% DIT	% T ₃	% T ₄	MIT/DIT	T ₃ /T ₄
Caseína	7	± 8,54 ± 1,69 ^a	± 20,25 ± 1,88 ^a	± 36,99 ± 3,72 ^a	± 2,04 ± 0,41 ^a	± 14,39 ± 4,45 ^a	± 0,55 ± 0,08 ^a	± 0,14 ± 0,04 ^a
Fração Acetônica (20 ml/100g)	7	± 7,78 ± 0,90 ^a	± 20,72 ± 1,66 ^a	± 38,15 ± 3,50 ^a	± 1,88 ± 0,82 ^a	± 13,19 ± 5,22 ^a	± 0,54 ± 0,04 ^a	± 0,15 ± 0,08 ^a
Caseína	7	± 5,03 ± 1,37 ^a	± 23,33 ± 2,75 ^a	± 40,21 ± 3,92 ^a	± 3,18 ± 0,54 ^a	± 17,65 ± 4,23 ^a	± 0,58 ± 0,03 ^a	± 0,18 ± 0,02 ^a
Fração Acetônica (60 ml/100g)	7	± 5,75 ± 0,88 ^a	± 21,35 ± 1,23 ^a	± 38,23 ± 2,56 ^a	± 3,59 ± 0,38 ^a	± 20,62 ± 2,06 ^a	± 0,56 ± 0,03 ^a	± 0,17 ± 0,02 ^a
Caseína	18	± 18,64 ± 4,90 ^a	± 17,76 ± 2,42 ^a	± 37,75 ± 3,49 ^a	± 1,67 ± 0,29 ^a	± 9,42 ± 2,07 ^a	± 0,47 ± 0,04 ^a	± 0,18 ± 0,03 ^a
Fração Acetônica	18	± 11,00 ± 1,54 ^b	± 20,11 ± 1,80 ^b	± 37,23 ± 2,26 ^a	± 1,57 ± 0,41 ^a	± 11,69 ± 3,86 ^a	± 0,54 ± 0,03 ^b	± 0,14 ± 0,03 ^b
Caseína	57	± 6,85 ± 2,02 ^a	± 21,67 ± 2,30 ^a	± 39,12 ± 4,51 ^a	± 0,62 ± 0,13 ^a	± 1,81 ± 0,99 ^a	± 0,56 ± 0,11 ^a	± 0,40 ± 0,13 ^a
Fração Acetônica	57	± 7,84 ± 2,34 ^a	± 21,94 ± 0,89 ^a	± 43,53 ± 3,47 ^b	± 0,46 ± 0,09 ^b	± 1,15 ± 0,32 ^a	± 0,50 ± 0,05 ^a	± 0,41 ± 0,10 ^a

¹ Média e Desvio Padrão

² Letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05)

to da tireóide do grupo Fração Acetônica foi praticamente igual ao seu Controle.

Uma vez que a Fração Acetônica mostrou-se ativa quando testada em tireóides isoladas e em ensaios "in vivo" de 24hs, era de se esperar que pelo menos nos ensaios de 57 dias ela provocasse um aumento no peso da glândula, o que porém, não ocorreu.

É possível que a concentração do fator ativo, quando ensaiado na presença da ração, deva ser superior para que uma ação se faça detectável. A presença da ração pode alterar a absorção e o metabolismo do fator, ou mesmo liga-lo, de forma a torna-lo menos eficiente. Outra explicação poderia estar ligada ao teor normal de iodo na ração. Em vista desta segunda possibilidade conduzimos ensaios semelhantes, mas agora em situação de restrição de iodo.

Nessas condições foram estudadas tanto as frações de baixo como, posteriormente, as de alto peso molecular.

4.2 - Ensaios com Rações com Restrição de Iodo

Para esses ensaios eliminamos o iodo da mistura salina e fornecendo-se aos animais água destilada e deionizada. Além disso nos ensaios de frações de baixo peso molecular substituiu-se a fonte proteica caseína (mais rica em iodo) pelo glúten suplementado com lisina. Nos estudos das frações de alto peso molecular utilizou-se o glúten suplementado, como controle e, nos grupos experimentais, utilizou-se a própria proteína de soja (suplementada com metionina) presente nos produtos de fracionamento.

A suplementação com lisina ou metionina conforme o caso foi necessária para garantir um crescimento homogêneo, principalmente

nas experiências com frações de alto peso molecular, onde tínhamos duas fontes de proteína distintas, uma para o grupo controle e outra para os experimentais.

4.2.1 - Efeito das frações de baixo peso molecular

Os efeitos da Fração Acetônica nesse caso (restrição em iodo) foram estudadas em ensaios de 10, 24 e 84 dias.

Nos ensaios de 84 dias, por razões de dificuldades de preparação no laboratório, a Fração Acetônica foi substituída pelo Extrato Aquoso (fase anterior da purificação). Testes anteriormente realizados em ensaios de 24hs "in vivo"⁽¹²⁾ e com tireóide isoladas mostraram um comportamento semelhante entre esses dois produtos de fracionamento da soja, permitindo essa substituição.

Nos três ensaios realizados não foi constatada nenhuma diferença significativa no peso final e na quantidade de ração ingerida (Tabela 5). Nos experimentos de 84 dias não observamos nenhuma variação no coeficiente de eficácia alimentar, apenas, a digestibilidade aparente determinada na última semana do ensaio, do grupo experimental ($91,7\% \pm 1,05$) foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle ($93,8 \pm 0,37$) (Tabela 5). Nas determinações de peso relativo dos órgãos sô verificamos um aumento no peso da tireóide nos ensaios de 10 dias.

- Com relação aos efeitos sobre a tireóide, nos três períodos experimentais conduzidos, sô observamos uma diminuição na porcentagem de captação relativa, nos ensaios de 10 dias. Por outro lado, as determinações dos hormônios e seus precursores a nível glândular e suas relações (MIT/DIT e T_3/T_4) não evidenciaram

TABELA 5 - Efeito das frações de baixo peso molecular sobre o crescimento e peso de órgãos. Rações com restrição em iodo^{1,2}

Grupos	Dias	Peso rato (g)		Ração ingerida (g)	peso/100g rato			
		Inicial	Final		Tireóide mg	Fígado g	Baço g	Rim g
Glúten	10	109,0 ± 4,2	170,0 ± 6,5 ^a	178,8 ± 9,9 ^a	7,58 ± 1,15 ^a	ND	ND	ND
Fração Acetônica	10	109,2 ± 3,4	169,6 ± 7,5 ^a	180,7 ± 12,0 ^a	8,95 ± 1,26 ^b	ND	ND	ND
Glúten	24	68,4 ± 6,8	171,1 ± 14,0 ^a	314,0 ± 28,8 ^a	8,86 ± 0,86 ^a	4,36 ± 0,51 ^a	0,30 ± 0,07 ^a	0,81 ± 0,06 ^a
Fração Acetônica	24	67,5 ± 6,3	161,9 ± 16,6 ^a	305,8 ± 13,6 ^a	8,34 ± 1,12 ^a	4,11 ± 0,35 ^a	0,30 ± 0,05 ^a	0,80 ± 0,09 ^a
Glúten	84	45,4 ± 4,8	288,6 ± 42,0 ^a	1194,6 ± 111,3 ^a	10,44 ± 1,99 ^a	3,43 ± 0,19 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,65 ± 0,04 ^a
Extrato Aquoso	84	44,8 ± 4,1	280,8 ± 31,4 ^a	1257,1 ± 105,2 ^a	10,05 ± 1,26 ^a	3,37 ± 0,22 ^a	0,21 ± 0,03 ^a	0,67 ± 0,05 ^a

¹ Média e Desvio Padrão

² Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$)

TABELA 6 - Efeito das frações de baixo peso molecular sobre a tireóide. Rações com restrição em iodo^{1,2}.

Grupos	Dias	% Captação relativa	% MIT	% DIT	% T ₃	% T ₄	MIT/DIT	T ₃ /T ₄
Glúten	10	11,17 ± 1,44 ^a	21,23 ± 3,22 ^a	39,08 ± 5,86 ^a	2,21 ± 0,73 ^a	16,70 ± 5,06 ^a	0,55 ± 0,11 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
Fração Acetônica	10	9,22 ± 0,56 ^b	18,65 ± 2,23 ^a	37,56 ± 4,84 ^a	2,21 ± 0,52 ^a	17,48 ± 3,55 ^a	0,50 ± 0,08 ^a	0,12 ± 0,01 ^a
Glúten	24	6,74 ± 0,87 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fração Acetônica	24	7,61 ± 1,08 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glúten	84	15,91 ± 2,40 ^a	29,17 ± 1,58 ^a	40,67 ± 2,86 ^a	1,06 ± 0,35 ^a	9,33 ± 4,54 ^a	0,72 ± 0,04 ^a	0,12 ± 0,03 ^a
Extrato Aquoso	84	15,80 ± 2,00 ^a	28,00 ± 1,68 ^a	40,06 ± 2,50 ^a	1,19 ± 0,54 ^a	10,35 ± 5,21 ^a	0,70 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,02 ^a

¹ Média e Desvio Padrão

² Letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05)

nenhuma variação significativa (Tabela 6).

Pelos resultados aqui obtidos, com as frações de baixo peso molecular incorporadas em rações com e sem iodo, concluímos que o fator nelas presente, apesar de se mostrar ativo em ensaios "in vitro" e anteriormente "in vivo"⁽¹²⁾, ou não é suficientemente ativo ou está em uma concentração relativamente baixa. A glândula, em ambos os casos, aparentemente conseguiu após um determinado período equilibrar e superar qualquer efeito nela causado. Os nossos resultados se opõem aos de KONIJN e col.⁽²⁸⁾, segundo os quais frações semelhantes à nossa, porém, obtidas de soja crua, quando incorporadas à rações de farinha de soja tostada, aumentavam a capacidade de ligação das proteínas do soro de rato pelo T_3 exógeno radioativo já a partir de 10 dias.

Nesse caso podemos dizer, também, que a quantidade de fator presente nessas frações talvez esteja relacionada com a variedade da soja analisada.

4.2.2 - Efeito das frações de alto peso molecular

A partir de dados anteriores de nosso laboratório e, com base na literatura, resolvemos verificar a possível existência de outro tipo de fator, associado à fração protéica de alto peso molecular e não extraível com água ou solventes orgânicos. Foram assim realizadas 3 experiências: a 1a. por um período de 10 dias, em que testamos a FDA e o Resíduo Aquoso e a 2a. em que testamos novamente a FDA e um resíduo mais purificado, o Resíduo Metanol-Acetona, por 14 dias. A 3a. experiência foi realizada em função dos resultados da 1a e 2a; como verificamos que ambos

os resíduos testados provocavam praticamente o mesmo efeito na glândula, estudamos o efeito de apenas um deles, o Resíduo Extração com Água por um período mais longo, de 84 dias.

Nos 3 ensaios estudados não observamos nenhuma alteração no peso final e ração ingerida (Tabela 7).

Nos ensaios de 84 dias porêm conseguimos detectar uma diminuição significativa na digestibilidade aparente do grupo experimental ($86,38 \pm 1,69$) em relação ao grupo controle ($93,22 \pm 0,56$); por sua vez, o Índice de Coeficiente de Eficácia Alimentar do grupo Resíduo Extração com Água também mostrou uma diminuição de 10%, em relação ao seu controle sendo respectivamente iguais a $0,18 \pm 0,01$ e $0,20 \pm 0,01$.

Os pesos relativos da tireóide dos grupos experimentais mostraram, em todos os casos, um aumento significativo em relação aos seus respectivos controles (Tabela 7).

Nos ensaios de 10 dias o aumento foi de 32,5% para o grupo que recebeu FDA e 28,6% para o grupo que recebeu Resíduo Extração com Água. Nos ensaios de 14 dias o aumento foi de 36,8% e 34,4% respectivamente para o grupo FDA e Resíduo Metanol-Acetona. Finalmente nos ensaios de 84 dias de Resíduo Extração com Água mostrou um aumento de 40,1% em relação ao Controle.

Esses resultados estão em parte de acordo com os encontrados por outros autores. BLOCK e col.⁽⁴⁾ verificaram que ratos alimentados com rações deficientes em iodo ($0,7 - 2,3 \mu\text{g}$ de iodo/100g de ração), associadas a produtos derivados de soja como farinha crua ou desengordurada e tostada, isolado protéico e fórmulas infantis (leite de soja), provocavam um aumento no peso da glândula, já na 1a. ou 2a. semana. Segundo os autores essa

TABELA 7 - Ação das frações de alto peso molecular sobre o crescimento e peso de órgãos. Rações com restrição em iodo^{1,2}.

Grupos	Dias	Peso rato (g)		Ração ingerida (g)	Peso/100g rato			
		Inicial	Final		Tireóide mg	Fígado g	Baço g	Rim g
Glúten	10	± 100,3 7,9	± 167,7 11,9 ^a	± 182,8 12,1 ^a	± 8,58 1,77 ^a	ND	ND	ND
FDA	10	± 100,0 6,5	± 169,2 16,7 ^{ac}	± 179,4 12,6 ^{ac}	± 12,72 2,45 ^{bc}	ND	ND	ND
Resíduo Extr. Água	10	± 96,5 5,5	± 160,5 10,8 ^{ac}	± 174,0 16,9 ^{ac}	± 12,03 2,77 ^{bc}	ND	ND	ND
Glúten	14	± 75,2 6,6	± 131,2 10,7 ^a	± 182,6 14,4 ^a	± 7,35 1,54 ^a	± 4,84 0,33 ^a	± 0,32 0,04 ^a	± 0,76 0,06 ^a
FDA	14	± 76,6 5,8	± 136,0 10,4 ^{ac}	± 185,0 10,1 ^{ac}	± 11,63 1,84 ^{bc}	± 4,31 0,25 ^{bc}	± 0,30 0,04 ^{ac}	± 0,81 0,04 ^{bc}
Resíduo Metanol-Acetona	14	± 76,6 6,7	± 137,7 9,8 ^{ac}	± 185,0 14,9 ^{ac}	± 11,20 2,77 ^{bc}	± 4,06 0,42 ^{bc}	± 0,32 0,04 ^{ac}	± 0,79 0,04 ^{ac}
Glúten	84	± 48,1 2,0	± 299,7 17,9 ^a	± 1220,4 130,0 ^a	± 8,65 1,41 ^a	± 3,38 0,12 ^a	± 0,21 0,05 ^a	± 0,64 0,04 ^a
Resíduo Ext. Água	84	± 48,3 2,3	± 291,1 31,9 ^a	± 1302,2 141,4 ^a	± 14,45 3,73 ^b	± 3,41 0,39 ^a	± 0,19 0,03 ^a	± 0,67 0,06 ^a

¹ Média e Desvio Padrão

² Letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05)

ação poderia ser revertida após a introdução de 160 μ g de iodo/100g de ração.

Outros pesquisadores⁽⁵⁸⁾ encontraram que ratos alimentados com rações preparadas com derivados de soja (queijo de soja) e deficientes em iodo, mostraram um aumento no peso da glândula, efeito que podia, em parte, ser revertido pela introdução de iodo. KIMURA e col.⁽²⁵⁾ observaram um aumento da tireóide um pouco menor em ratos alimentados com proteína isolada de soja do que quando alimentados com farinha desengordurada de soja, porém, em ambos os casos, observaram um aumento bastante significativo quando comparados com seu grupo Controle, que também recebia ração pobre em iodo.

Quanto ao peso relativo dos outros órgãos, determinado em ensaios de 14 e 84 dias, foi encontrada uma diminuição significativa no peso do fígado, nos ensaios de 14 dias, sendo de 10,9% para o grupo FDA e 15,5% para o grupo Resíduo Metanol-Acetona (Tabela 7). Nesse mesmo experimento observamos, também, um aumento significativo de 6,6% do peso do rim só no grupo que recebeu FDA (Tabela 7).

Com relação ao efeito específico sobre a tireóide, nos estudos de 10 dias não verificamos alterações significativas na % de captação relativa tanto do grupo FDA bem como no grupo que recebeu Resíduo Extração com Água (Tabela 8). Porém nos ensaios de 14 dias observamos uma diminuição em relação ao grupo Controle de 34,8% e 31,5%, respectivamente para o grupo FDA e Resíduo Metanol-Acetona (Tabela 8).

Essa diminuição foi também demonstrada no Resíduo da Extração com Água nos ensaios de 84 dias, correspondendo a 54,1% em

TABELA 8 - Ação das frações de alto peso molecular sobre a tireoide. Rações com restrição em iodo^{1,2}.

Grupos	Dias	% Captação relativa	% MIT	% DIT	% T ₃	% T ₄	MIT/DIT	T ₃ /T ₄
Glúten	10	± 14,08 ± 3,79 ^a	± 17,86 ± 2,02 ^a	± 37,43 ± 2,35 ^a	± 1,92 ± 0,60 ^a	± 14,84 ± 2,84 ^a	± 0,47 ± 0,07 ^a	± 0,12 ± 0,02 ^a
FDA	10	± 14,93 ± 4,68 ^{ac}	± 23,39 ± 1,40 ^b	± 27,53 ± 1,70 ^b	± 2,95 ± 0,42 ^b	± 19,04 ± 2,55 ^b	± 0,85 ± 0,07 ^b	± 0,15 ± 0,03 ^b
Resíduo Ext. Água	10	± 14,88 ± 6,30 ^{ac}	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glúten Ext. Água	14	± 22,66 ± 5,55 ^a	± 22,32 ± 2,91 ^a	± 35,60 ± 4,62 ^a	± 1,51 ± 0,17 ^a	± 13,58 ± 1,55 ^a	± 0,63 ± 0,11 ^a	± 0,11 ± 0,01 ^a
FDA	14	± 14,76 ± 2,55 ^{bc}	± 28,98 ± 1,69 ^{bc}	± 30,02 ^{bc} ± 1,34	± 2,28 ± 0,58 ^{bc}	± 11,76 ± 3,64 ^{ac}	± 0,96 ± 0,08 ^{bc}	± 0,20 ± 0,06 ^{bc}
Resíduo Metanol- Acetona	14	± 15,52 ± 4,82 ^{bc}	± 30,52 ± 2,70 ^{bc}	± 29,89 ± 1,90 ^{bc}	± 3,32 ^{bd} ± 0,91	± 14,51 ± 3,35 ^{ac}	± 1,02 ± 0,08 ^{bc}	± 0,23 ± 0,05 ^{bc}
Glúten	84	± 12,31 ± 1,37 ^a	± 28,14 ± 3,36 ^a	± 29,96 ± 4,07 ^a	± 2,74 ± 0,93 ^a	± 20,36 ± 2,91 ^a	± 0,96 ± 0,18 ^a	± 0,13 ± 0,03 ^a
Resíduo Ext. Água	84	± 6,66 ± 2,89 ^b	± 34,42 ± 4,09 ^b	± 25,70 ± 3,42 ^b	± 5,03 ± 1,58 ^b	± 13,07 ± 3,95 ^b	± 1,35 ± 0,23 ^b	± 0,42 ± 0,19 ^b

¹Média e Desvio Padrão

²Letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05)

relação ao seu Controle (Tabela 8).

Com relação aos dados referentes à % de hormônios marcados, a nível tireoidiano, constatamos alterações semelhantes em praticamente todos os grupos analisados (Tabela 8).

Assim, observamos um aumento da % MIT e % T_3 acompanhado de uma diminuição da % DIT. Verificamos, também, uma diminuição da % T_4 nos ensaios de 10 e 84 dias que não foi porém observada nos ensaios de 14 dias. Por outro lado as relações MIT/DIT e T_3/T_4 apresentaram-se aumentadas em relação aos seus controles em todas os casos analisados.

A dosagem dos hormônios séricos só foi realizada no ensaio de 84 dias. Os resultados de T_3 sérico do grupo controle foi de $1,00 \pm 0,11$ ng/ml e do grupo que recebeu Resíduo da Extração com Água foi $1,14 \pm 0,6$ ng/ml; após análise estatística verificamos que essa diferença não foi significativa. O T_4 sérico, porém, mostrou diferença significativa entre o grupo controle ($5,07 \pm 0,75$ µg/100 ml) e o experimental ($2,81 \pm 0,90$ µg/100 ml).

Os nossos resultados vão confirmar, em parte, os resultados obtidos por alguns pesquisadores⁽⁵⁸⁾ os quais verificaram que ratos alimentados com derivados de soja mostraram uma diminuição na % de captação de I-131 pela tireóide e um aumento na relação MIT/DIT.

É oportuno enfatizar aqui que os resultados obtidos com a FDA ou com os resíduos obtidos, quer por extração com água quer por extração com metanol e acetona, não mostraram diferenças acentuadas; a única exceção foi relativa às % T_3 na tireóide (vide Tabela 8).

Isso nos leva a crer que o fator, com maior ação na ti-

reóide, não foi extraído durante as etapas de fracionamento da soja e dessa forma podemos dizer que ele não é solúvel em meio aquoso (pH 4,2), metanol 90% e acetona. O tratamento com metanol⁽⁶⁷⁾ foi realizado com a finalidade de extrair principalmente as saponinas, uma vez que como já foi sugerido que elas poderiam ser um dos compostos responsáveis pela indução do bôcio provocado pela soja⁽⁵⁷⁾. Após extração com metanol, o resíduo resultante foi extraído com acetona para remoção das flavonóides presentes os quais também poderiam ter alguma ação na tireóide, como sugerido por outros pesquisadores que verificaram que muitos flavonóides são capazes de acelerar⁽³⁶⁾ ou diminuir⁽²³⁾ o metabolismo basal e, depressur⁽⁵²⁾ ou aumentar⁽⁴⁸⁾ a captação de radioiodo pela tireóide. Por outro lado FILISETTI e LAJOLLO⁽¹²⁾ verificaram que as isoflavonas da soja eram incapazes de provocar alterações nas tireóides, pelo menos em ensaios de 24hs.

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos realizamos um exame anatomopatológico da tireóide a fim de verificar as alterações provocadas a nível celular e ter indicações adicionais que permitissem sugerir algum mecanismo de ação.

4.3 - Exame Anatomopatológico da Tireóide

Esse exame só foi realizado nos dois ensaios de 84 dias pois, só após um período relativamente longo é que poderíamos perceber com mais nitidez as alterações provocadas pelos produtos de fracionamento da soja nas estruturas do folículo. Nesse caso os produtos testados foram: Resíduo da Extração com Água e Extrato Aquoso.

4.3.1 - Exame macroscópico

A observação macroscópica da tireóide mostrou um aumento de volume só no grupo de animais que receberam Resíduo de Extração com Água e, nesse caso, apresentavam uma congestão visivelmente maior em relação ao seu Controle.

4.3.2 - Exame microscópico

Apenas o grupo que recebeu Resíduo de Extração com Água revelou alterações dignas de nota.

Os cortes histológicos, corados com HE e PAS, dos animais do grupo Controle foram representados na Figura 3 e 4. Na figura 3 (HE) observamos que os folículos apresentam um epitélio uni-estratificado com quantidade variável de colóide e com predominância do mesmo na região sub-capsular. Os núcleos apresentam uma cromatina ora frouxa ora condensada (hipercromática) com nucléolos visíveis apenas na frouxa. O interstício está representado por um delicado estroma conjuntivo-vascular com discreto grau de congestão.

Na Figura 4 (PAS) observamos que não há depleção de colóide, mas os folículos da periferia o contêm em maior quantidade, em relação aos da região central.

Os cortes corados com HE e PAS correspondentes aos animais do grupo experimental estão representados na Figura 5 e 6. Na Figura 5 (HE) verificamos que os folículos são de tamanho mais ou menos uniforme e revestidos por um epitélio cilíndrico uni-estratificado. Os núcleos apresentam uma cromatina frouxa localizada mais

Figura 3 - Fotomicrografia de tireóide de rato do grupo controle (Glúten). Aumento 100x. Coloração: H.E.

Figura 4 - Fotomicrografia de Tireóide de rato do grupo controle (Glúten). Aumento 40x. Coloração: PAS

Figura 5 - Fotomicrografia de tireóide de rato do Grupo Resíduo Extração com Água. Aumento 100x. Coloração: H.E.

Figura 6 - Fotomicrografia de tireóide de rato do Grupo Resíduo Extração com Água. Aumento 40x. Coloração: PAS.

na região periférica, deixando no centro um halo claro onde visualizamos nitidamente o nucléolo. O interstício está representado por um delicado estroma conjuntivo-vascular; o que chama atenção é a congestão homogênea e intensa. Na Figura 6 (PAS) observamos que na porção central da glândula a depleção do colóide é intensa, sendo que os folículos um pouco mais ricos em colóide estão na região sub-capsular.

Este tipo de imagem histológica (Resíduo e Extração com Água) está representada em 75% dos casos analisados. Em dois casos desse grupo, isto é, 25%, a imagem histológica estava mais próxima da imagem descrita para o grupo Controle e, portanto, não foi possível fazer um diagnóstico diferencial do corte histológico desses animais em relação ao grupo Controle. Nesse caso, porém, ambas as % de captação relativa foram as mais altas desse grupo, porém, inferiores à média do grupo Controle; isso talvez explique a variação da imagem histológica dentro do grupo.

Informações semelhantes foram encontradas por outros pesquisadores⁽⁵⁸⁾ os quais, por outro lado, observaram que ratos alimentados durante 2 meses, com rações que continham derivados de soja e suplementados com iodo (20 µg/100g ração), não mostravam aumento na glândula e, o tamanho e a distribuição dos folículos parecia normal; contudo eles observaram um aumento de elementos para-foliculares.

É interessante notar que o comportamento da tireóide, descrito até agora, é semelhante ao de uma glândula que esteja com depleção em iodo⁽⁸⁾⁽⁵⁶⁾, só que ao invés de termos um aumento na captação de I-131 como seria o caso, observamos o inverso.

Após análise detalhada do presente quadro chegamos à con

clusão que o fator presente na soja, tanto o de ação fraca, presente nas frações de baixo peso molecular, como o mais ativo, presente nas frações de alto peso molecular, age a nível de entrada de iodo.

As frações de baixo peso molecular, em ensaios realizados "in vitro" e em experimentos de 18 dias (dietas com iodo) e 10 dias (dietas com deficiência em iodo), provocaram uma diminuição na % de captação relativa; esse mesmo efeito foi observado em ensaios de 14 e 84 dias com frações de alto peso molecular. Pelo exposto acima descartamos a hipótese do fator agir no mecanismo de organificação do iodo, ou no mecanismo oxidativo de acoplamento de pares de DIT, para dar origem ao T_4 ou de pares de MIT e DIT para dar origem ao T_3 ⁽⁵⁹⁾.

A ação resulta no aumento da síntese de MIT e T_3 e, numa diminuição de DIT e T_4 , como consequência, há uma diminuição de T_4 sérico, o que por sua vez, através de um mecanismo de retroalimentação via hipófise, induziria a liberação de TSH estimulando consequentemente as células do lóbulo a aumentarem a velocidade de síntese da tireoglobulina. Isso, ao mesmo tempo, provocaria um aumento da ~~p~~roxítose e como resultado final, haveria uma rarefação do colóide no interior dos ácinos, como observado.

4.4 - Efeito dos Produtos da Hidrólise Enzimática

Durante as etapas de processamento, para obtenção do Resíduo Metanol-Acetona, foram eliminados uma série de compostos de baixo peso molecular que poderiam ser os responsáveis pela ação na tireoide; contudo como já descrito anteriormente, essa fração

continuou ativa. Após análise desse produto, verificamos que era constituído principalmente de proteína e fibra; isso nos levou a pensar que uma hidrólise enzimática, com pepsina e pancreatina, poderia destruir a atividade do fator, caso estivesse ligado a compostos de origem protéica. Por outro lado, a hidrólise poderia "liberar" algum composto ativo que estivesse ligado à proteína⁽²⁷⁾ e, nesse caso, poderíamos separá-lo, numa 1ª. fase, da fibra existente.

Após a hidrólise verificamos, porém, que tanto o hidrolisado como o resíduo manifestavam ação na tireóide e, que essa ação era semelhante (Tabela 9 e 10).

Observou-se em ambas as frações uma diminuição significativa na % de captação relativa e um aumento do peso relativo da tireóide. A % DIT mostrou uma diminuição significativa em ambos os grupos experimentais, em relação ao Controle, não havendo, porém, diferença entre eles. Por outro lado, a % T_4 mostrou uma diminuição em relação ao Controle apenas para Resíduo da Hidrólise. Apesar do aumento da % MIT em ambos os casos não ser significativa, observamos um aumento de T_3 causado pelo Hidrolisado.

Normalmente é mais fácil analisar esse tipo de dados através das relações entre os hormônios e os respectivos precursores; verificou-se assim, em ambos os casos, um aumento das relações MIT/DIT e T_3/T_4 , não havendo porém diferença significativa dos dois grupos experimentais entre si.

Devemos salientar ainda que o Coeficiente de Eficácia Alimentar do Hidrolisado ($0,34 \pm 0,03$) e do Resíduo da Hidrólise ($0,33 \pm 0,02$) também não apresentaram variação significativa entre si ou em relação ao seu controle ($0,33 \pm 0,02$).

TABELA 9 - Efeito dos produtos da hidrólise enzimática sobre o crescimento e peso da tireóide. Rações com restrição em iodo^{1,2}.

G r u p o s	Peso rato (g)		Ração ingerida (g)	Peso tireóide (mg)
	Inicial	Final		100g rato
Glúten	102,3 ± 6,7	195,4 ± 19,8 ^a	277,8 ± 30,6 ^a	12,10 ± 1,53 ^a
Resíduo da Hidrólise	107,9 ± 6,3	206,6 ± 19,7 ^{ac}	288,8 ± 29,9 ^{ac}	15,17 ± 2,03 ^{bc}
Hidrolisado	106,8 ± 7,9	214,9 ± 21,6 ^{ac}	316,2 ± 30,2 ^{bc}	14,06 ± 3,45 ^{ac}

¹Média e Desvio Padrão (Duração da experiência 19 dias)

²Letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05)

TABELA 10 - Efeito dos produtos da hidrólise enzimática sobre a tireoide. Rações com restrição de iodo^{1,2}

Grupos	Dias	% Captação relativa	% MIT	% DIT	% T ₃	% T ₄	MIT/DIT	T ₃ /T ₄
Glúten	19	19,69 ± 3,41 ^a	26,42 ± 1,68 ^a	32,27 ± 0,99 ^a	1,84 ± 0,22 ^a	9,31 ± 2,07 ^a	0,81 ± 0,04 ^a	0,20 ± 0,03 ^a
Resíduo da hidrólise	19	11,55 ± 3,86 ^{bc}	27,42 ± 2,52 ^{ac}	27,60 ± 3,44 ^{bc}	2,23 ± 0,71 ^{ac}	6,26 ± 2,08 ^{bc}	1,01 ± 0,20 ^{bc}	0,37 ± 0,10 ^{bc}
Hidrolisado	19	8,90 ± 2,78 ^{bc}	29,16 ± 5,75 ^{ac}	25,84 ± 2,99 ^{bc}	3,71 ± 1,25 ^{bd}	9,86 ± 3,32 ^{ad}	1,14 ± 0,27 ^{bc}	0,41 ± 0,22 ^{bc}

¹ Média e Desvio Padrão

² Letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05)

Em vista desses resultados podemos afirmar, somente, que a hidrólise enzimática não inativa o fator com ação na tireóide e, que o produto responsável por essa ação encontra-se distribuído em ambas as frações, igualmente.

Avaliando-se os dados obtidos por nós, associados aos da literatura podemos concluir que:

- a) a soja autoclavada apresenta um fator de baixo peso molecular, termoresistente, extraível por água e solúvel em acetona, capaz de reduzir a captação de iodo em ensaios agudos "in vivo" e em tireóides isoladas "in vitro";
- b) esse fator, de baixo peso molecular, tem pequeno significado biológico, por não ser ativo, quando administrado em rações por prazos longos, tanto em condições de restrição de iodo como em situações de iodo normal;
- c) existe um fator na soja autoclavada, associado à fração de alto peso molecular, não hidrolisável pela pepsina e pancreatina, capaz de, quando presente em rações com baixos teores de iodo, provocar, a partir de 14 dias, um aumento no peso da tireóide, uma redução na captação de iodo e alterações a nível glandular dos hormônios e seus precursores. Em prazos mais longos (84 dias) esse fator é capaz de provocar ainda a diminuição do T_4 sérico, associada a mudanças na histologia da glândula, representadas, principalmente, por redução no colóide;
- d) o seu mecanismo tem semelhança com fatores que agem a nível de captação de iodo.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 - ASP, Nils-G.; JOHANSSON, Claes-G.; HALLMER, H.; SILJESTRÖM, M.
Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary
fiber. J. Agric. Food Chem., Washington, 31:476-82, 1983.
- 2 - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods
of analysis of the AOAC. 13. ed.. Washington, Assoc. Off.
Agric. Chem.. 1980. p.858.
- 3 - BECK, R.N. Soy flour and fecal thyroxine loss in rats.
Endocrinology, Springfield, 62:587-92, 1958.
- 4 - BLOCK, R.J. & MANDL, R.H. The curative action of iodine on
soybean goiter and the changes in the distribution of
iodoamino acids in the serum and in thyroid gland digests.
Arch. Biochem., New York, 93:15-24, 1961.
- 5 - CEVALLOS, J.L.G. Factores etiologicos del bocio endemico.
Invest. Clin., Maracaibo, 21:138-49, 1980.
- 6 - DELANGE, F.M. & ERMANS, A.M. Endemic goiter and cretinism :
naturally occurring goitrogens. Pharmacol. Ther., Part C ,
Oxford, 1:57-93, 1976.
- 7 - EKINS, R.P. The estimation of thyroxine in human plasma by
electrophoretic technique. Clin. Chim. Acta, Amsterdam ,
5:453-9, 1960.

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS
TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS
SERVICE SOURCE INDEX, Columbus, 1980.

- 8 - ERMANS, A.M. Endemic goiter and endemic cretinism. In: DeGROOT, L.J., ed. et alii. Endocrinology. New York, Grune & Stratton, 1979. v.1, p. 501-8.
- 9 - FARRIS, E.J. The rat in laboratory investigation. 2.ed. New York, Hafner Publishing Company, 1963. p.76-7.
- 10 - FEDERE, W.T. Experimental design. New York, MacMillan, 1955. 544 p.
- 11 - FENWICK, G.R.; HEANEY, R.K.; MULLIN, W.J. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Cleveland, 18:123-201, 1983.
- 12 - FILISETTI, T.M.C.C. & LAJOLO, F.M. Thyroid active factor in heated soybean fractions. J. Food Sci., Chicago, 45:1179-82, 1186, 1980.
- 13 - FILISETTI, T.M.C.C. & LAJOLO, F.M. Efeito da ingestão de frações de soja crua ou autoclavada sobre a tireóide de ratos. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 31:287-302, 1981.
- 14 - FILISETTI, T.M.C.C.; MARQUEZ, U.M.L.; MANCINI FILHO, J.; LAJOLO, F.M. Fatores antinutricionais em alguns produtos comerciais de soja. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, 15: 93-108, 1977.
- 15 - FOX, M.R.S. & BRIGGS, G.M. Salt mixture for purified-type diet. III. An improved salt mixture for chicks. J. Nutr., Philadelphia, 72:242-50, 1960.
- 16 - GREER, M.A. Nutrition and goiter. Physiol. Rev., Washington, 30:513-48, 1950.
- 17 - GREER, M.A. Thyroid hormones. II. The natural occurrence of goitrogenic agents. Recent Progr. Horm. Res., New York, 18:187-219, 1962.

- 18 - HALVERSON, A.W.; ZEPPLIN, M.; HART, E.B. Relation of iodine to the goitrogenic properties of soybeans. J. Nutr., Philadelphia, 38:115-29, 1949.
- 19 - HYDOVITZ, J.D. Occurrence of goiter in an infant on soy diet. N. Engl. J. Med., Boston, 262:351-3, 1960.
- 20 - IINO, S. Comparison of the effects of various goitrogens on biosynthesis of thyroid hormones in vitro. Acta Endocrinol., Copenhagen, 36:212-20, 1961.
- 21 - IKEDA, E.; NICOLAU, W.; MURAMOTO, E.; MARQUES DE ASSIS, L. ; PIERONI, R.R. Separação de compostos iodados biliares e fecais por filtração em Sephadex G-25 M. Estudo do metabolismo entero-hepático da 125- ℓ -tiroxina. Rev. Ass. Méd. Brasil., São Paulo, 19:131-6, 1973.
- 22 - INTERNATIONAL DEVELOPMENT RESEARCH CENTER. Summary of the general discussion on chronic cassava toxicity. Ottawa , 1973. p.159-62.
- 23 - JENEY, E. New date of pharmacology of flavonoids. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., Budapest, 34:193-212, 1968.
- 24 - KIMURA, S. Comparative studies on the goitrogenic activities of defatted soybean and soybean protein isolate. Rep. Res. Soy Prot. Nutr., 1:48-50, 1980.
- 25 - KIMURA, S.; KAWAMURA, M.; HIRAMA, M. Comparative studies on the goitrogenic activities of the soybean and soy protein isolate. Rep. Res. Soy Prot. Nutr., 3:18-23, 1982.
- 26 - KIMURA, S.; SUWA, J.; ITO, M.; SATO, H. Development of malignant goiter by defatted soybean with iodine-free diet in rats. Gann, Tokyo, 67:763-5, 1976.

- 27 - KOHJI, H. Thiocyanate in soybean products. Kaseigaku Zasshi, Tokyo, 34:334-8, 1983.
- 28 - KONIJN, A.M.; EDELSTEIN, S.; GUGGENHEIN, K. Separation of a thyroid-active fraction from unheated soya bean flour. J. Sci. Food Agric., London, 23:549-55, 1972.
- 29 - KONIJN, A.M.; GERSHON, B.; GUGGENHEIN, K. Further purification and mode of action of a goitrogenic material from soybean flour. J. Nutr., Philadelphia, 103:378-83, 1973.
- 30 - LAJOLO, F.M. Estudo bromatológico de concentrados protéicos de Sardinella aurita e de Tilapia melanopleura obtidos por extração com isopropanol. São Paulo. Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 1969. [Tese de doutoramento].
- 31 - LIENER, I.E. Legume toxins in relation to protein digestibility: a review. J. Food Sci., Chicago, 41:1076-81, 1976.
- 32 - LIENER, I.E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 58:406-15, 1981.
- 33 - LIENER, I.E. & KAKADE, M.L. Protease inhibitors. In: LIENER, I. E. Toxic constituents of plant foodstuffs. New York , Academic Press, 1969. p.7-68.
- 34 - LISON, L. Histochemie et cytochemie animales. 3. ed. Paris, Gauthier-Villars, 1960. 2v.
- 35 - McCARRISON, R. The goitrogenic action of soya-bean and groundnut. Indian. J. Med. Res., New Delhi, 21:179-81, 1933.
- 36 - McLAREN, G.A.; ASPLUND, R.O.; CROW, D.G.; TSAI, L.I.; PORTER FIELD, I.D. Influence of dried-grass silage and silage fractions on basal metabolic rate of rats. J. Nutr., Philadelphia, 83:218-24, 1964.

- 37 - MEYER, E.W. Soya protein isolates for food. In: LAWRIE, R. A. Proteins as human food. London, Butterworths, 1970. p.346-62.
- 38 - MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo, E.P.U., 1980. p.46.
- 39 - MURPHY, B.P. The determination of thyroxine by competitive protein-binding analysis employing an anion-exchange resin and radiothyroxine. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, 66: 161-7, 1965.
- 40 - MURPHY, B.F.P. & PATTEE, C.J. Determination of thyroxine utilizing the property of protein-binding. J. Clin. Endocrinol. Metab., Philadelphia, 24:187-96, 1964.
- 41 - NAGATAKI, S. Effect of excess quantities of iodide. In: GEIGER, S.R., ed. Handbook of physiology. Washington, American Physiological Society, 1974, v.3, p.329-44.
- 42 - NORDSIEK, F.W. Effects of added casein on goitrogenic action of different dietary levels of soybeans. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., New York, 110:417-20, 1962.
- 43 - NORMAS analíticas do Instituto Adolfo Lutz para análise de alimentos. 2.ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1976. v.1, p.24,37,95.
- 44 - PEARSE, A.G.E. Histochemistry 3.ed. London, Churchill, 1968. 2v.
- 45 - PINCHERA, A.; MacGILLIVRAY, M.H.; GRAWFORD, J.D.; FREEMAN, A. G. Thyroid refractoriness in an athyreotic cretin fed soybean formula. N. Engl. J. Med., Boston, 273:83-7, 1965.
- 46 - QASIN, S.A. & STELZIG, D.A. Stimulation of basal metabolic rate of rats fed dried-grass silage flavonoids. J. Nutr., Philadelphia, 103:1658-64, 1973.

- 47 - RACKIS, J.J. Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 51:161A-74A, 1974.
- 48 - REILLY, W.A.; SCOTT, K.G.; WHITE, W.E. Increase of uptake of iodine-131 by the thyroid gland after administration of hesperidine methyl chalcone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 81:682-3, 1952.
- 49 - SAGHIR, A.R.; COWAN, J.W.; SALJI, J.P. Goitrogenic activity of onion volatiles. Nature, London, 211:87, 1966.
- 50 - SCHINGOETHE, D.J.; AUST, S.D.; THOMAS, J.W. Separation of mouse growth inhibitor in soybeans from trypsin inhibitors. J. Nutr., Philadelphia, 100:739-48, 1970.
- 51 - SCHINGOETHE, D.J.; TIDEMANN, L.J.; UCKERT, J.R. Studies in mice on the isolation and characterization of growth inhibitors from soybeans. J. Nutr., Philadelphia, 104:104-12, 1974.
- 52 - SCOTT, K.G. & STREI, L. Effect of bioflavones upon metabolism of iodine and iodinated compounds in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 81:493-7, 1952.
- 53 - SHAPIRO, O. & GORDON, A. An improved method for separation of radioactive thyroid hormone metabolites by the thin-layer chromatography. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 121:577-9, 1966.
- 54 - SHARPLESS, G.R.; PEARSONS, J.; PRATO, G.S. Production of goiter in rats with raw with treated soy bean flour. J. Nutr., Philadelphia, 17:545-55, 1939.
- 55 - SHEPARD, T.H.; PYNE, G.E.; KIRSCHVINK, J.F.; McLEAN, M.C. Soybean goiter: report of three cases. N. Engl. J. Med., Boston, 262:1099-103, 1960.

- 56 - STUDER, H.; KOHLER, H.; BÜRGI, H. Iodine deficiency. In: GEIGER, S.R., ed. Handbook of physiology. Washington, American Physiological Society, 1974. v.3, p.303-28.
- 57 - SUWA, J. & KIMURA, S. Isolation and goitrogenic activity of soybean elements which affect thyroid function. Annu. Rep. Fac. Educ., Gunma Univ., Art. Technol. Health Phys. Educ., Sci. Hum. Living Ser., Maebashi, 17:71-78, 1981.
- 58 - SUWA, J.; KOYANAGI, T.; KIMURA, S. Studies on soybean factors which produced goiter in rats, J. Nutr. Sci. Vitaminol., Tokyo, 25:309-15, 1979.
- 59 - TAUROG, A. Hormone synthesis. In: DeGROOT, L.J. ed. et alii Endocrinology. New York, Grune & Stratton, 1979. v.1, p.331-42.
- 60 - VAN ETEN, C.H. Goitrogens. In: LIENER, I.E. Toxic constituents of plant foodstuffs. New York, Academic Press, 1969. p. 103-42.
- 61 - VAN MIDDLESWORTH, L. Thyroxine excretion, a possible cause of goiter. Endocrinology, Springfield, 61:570-3, 1957.
- 62 - VAN SOEST, P.J. & WINE, R.H. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 50: 50-5, 1967.
- 63 - VAN WYK, J.J.; ARNOLD, M.B.; WYNN, J.; PEPPER, F. The effects of a soybean product on thyroid function in humans. Pediatrics, Springfield, 24:752-60, 1959.
- 64 - WILGUS JR., H.S.; GASSNER, F.Z.; PATTON, A.R.; GUSTAVSON, R.G. The goitrogenicity of soybeans. J. Nutr., Philadelphia, 22:43-52, 1941.

- 65 - WILLS JUNIOR, J. H. Goitrogens in foods. In: TOXICANTS occurring naturally in foods. Washington, National Academy of Science, 1966. p.3-17.

- 66 - WOLF, W.J. & COWAN, D. Soybean as a food source. CRC Crit. Rev. Food Technol., Cleveland, 22:81-158, 1971.

- 67 - WOLF, W.J. & THOMAS, B.W. Thin layer and anion exchange chromatography of soybean saponins. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 47:86-90, 1970.

- 68 - WOLFF, J. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. Physiol. Rev., Washington, 44:45-90, 1964.

- 69 - YAMADA, T.; KAJIHARA, A.; TAKEMURA, Y.; ONAYA, T. Antithyroid compounds. In: GEIGER, S.R., ed. Handbook of physiology. Washington, American Physiological Society, 1974, v. 3, p.345-57.

RESUMO

Produtos de fracionamento da Farinha de Soja Desengordurada e Autoclavada foram administrados a ratos para avaliar sua ação na tireóide, em ensaios desde 7 até 84 dias de duração.

Frações de baixo peso molecular, solúveis em água e acetona, quando avaliadas em ensaios agudos, de 24hs ou "in vitro", provocaram uma diminuição na captação de I^{131} . Porém, quando avaliados em rações, em experiências de até 84 dias de duração, mesmo em condições de restrição de iodo, não apresentaram efeito significativo.

Por outro lado, identificou-se um fator, associado às frações de alto peso molecular, que induz, já a partir de 14 dias, quando administrado em rações com restrição em iodo, um aumento no peso da tireóide, redução na captação de I^{131} , alterações na síntese dos hormônios e seus precursores a nível glandular. Em ensaios mais longos (84 dias), provoca uma diminuição de T_4 sérico e uma rarefação bastante significativa no colóide do folículo glandular.

Por sua vez, a hidrólise de uma das frações de alto peso molecular, por pepsina e pancreatina, não é capaz de inativar a ação desse fator.

O seu mecanismo de ação parece ser semelhante ao de substâncias que agem a nível de captação de iodo pela tireóide.

SUMMARY

Defatted autoclaved soybean flour presented a water/acetone soluble fraction which is able to depress I-131 uptake by rat thyroids tested in 24hs "in vivo" or in 3hs "in vitro" assays. When this fraction was given to rats in ration with either normal or deficient iodine content for periods from 7 to 84 days no significant action was detected.

On the other hand a factor associated to the high molecular weight protein fraction was identified. The factor is active in rats starting from 14 days after ingestion, in rations with low iodine content producing: increase in thyroid weight, lowering of I-131 uptake, alteration on MIT/DIT, T_3/T_4 ratios and after 84 days of administration a significant reduction of serum T_4 and a large decrease of the colloid content of follicle.

Hydrolysis by pepsin or pancreatin does not eliminate the observed action. The mechanism of action of this factor seems to be related to a blockage of the iodine uptake.