

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**EFEITOS *IN VIVO* DO ESTRADIOL E DE FITOESTRÓGENOS SOBRE A  
SENSIBILIDADE À INSULINA E TRANSPORTADORES DE GLICOSE**

Luciana Pereira Dresseno

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Beatriz D'Agord Schaan

Porto Alegre, junho de 2012.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**EFEITOS *IN VIVO* DO ESTRADIOL E DE FITOESTRÓGENOS SOBRE A  
SENSIBILIDADE À INSULINA E TRANSPORTADORES DE GLICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas: Endocrinologia,  
para obtenção do título de Mestre.

Luciana Pereira Dresseno

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Beatriz D'Agord Schaan

Porto Alegre, junho de 2012.

Dresseno, Luciana Pereira.

Efeitos *in vivo* do estradiol e de fitoestrógenos sobre a sensibilidade à insulina e transportadores de glicose /Luciana Pereira Dresseno; orientação [por] Beatriz D'Agord Schaan – Porto Alegre, 2012.

Of.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, 2012.

1.Fitoestrógeno. 2.Climatério. 3.Transportador de glicose tipo 4.  
I.Beatriz D'Agord Schaan. II.Título.

CDU:

Bibliotecária Responsável:

CRB

## **Agradecimentos**

Agradeço a algumas pessoas que foram essenciais para realização deste estudo:

À professora orientadora Dra. **Beatriz D'Agord Schaan** pelos ensinamentos, competência, paciência e exemplo de pesquisadora.

À bióloga Dra. **Melissa Markoski** e ao educador físico **Dr. Alexandre Lehnen** pela eficiência, competência e essencial participação na realização da análise dos tecidos por *Western Blot*.

Às alunas de iniciação científica do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul **Emily Fagundes, Júlia Borges e Juliana Oliveira Rangel** pela ajuda em laboratório durante a experimentação animal.

Em especial ao estudante de medicina veterinária e aluno de iniciação científica do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul **Ariel Silveira da Silva** pela eficiência, competência e presteza durante a homogenização e análise dos tecidos por *Western Blot*.

Às técnicas do laboratório de experimentação animal **Lucinara Dadda Dias** e **Graziela Pinto** pela atenção, competência e presteza nos ensinamentos cirúrgicos e manuseio dos animais de laboratório.

À aluna de mestrado do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul **Camila Tremarin** pela amizade, atenção e carinho.

Às colegas de mestrado **Maristela Resch Lopes, Tatiana Ederich Lehnen** e **Verônica Colpani** pela amizade, carinho, generosidade e apoio.

À aluna voluntária do Programa de Ciências Médicas Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre **Magali Costa da Costa** pela amizade, carinho, generosidade e apoio na realização deste trabalho.

À médica veterinária da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre **Fabiola Shons Meyer** pela atenção, competência, carinho e auxílio na realização da experimentação animal.

À enfermeira chefe da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela generosidade, presteza, eficiência, carinho e apoio.

À secretária do Programa de Pós Graduação de Ciências Médicas Endocrinologia da UFRGS **Maria de Lourdes Ponte** pela atenção, paciência, presteza e carinho.

À minha querida avó **Maria Dresseno** e tia **Aida Dresseno** pela compreensão, carinho e os ensinamentos de toda a vida.

Aos meus irmãos **André Luiz Pereira Dresseno** e **Angela Pereira Dresseno** pela amizade, carinho e apoio em todas as horas.

À meus pais **Lauro Antonio Dresseno** e **Sayonara Pereira Dresseno** (*In memoriam*) que me fazem ter força para seguir adiante.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	8
BASE TEÓRICA .....	9
1 Introdução.....	10
2 CLIMATÉRIO: FITOESTRÓGENOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA.....	13
2.1 Estrógenos, Fitoestrógenos e Resistência Insulínica .....	14
3 Estrógeno, Fitoestrógeno e GLUT4 .....	17
4 Justificativa.....	32
5 Hipótese.....	33
6 Objetivos .....	34
6.1 Geral .....	34
6.2 Específicos.....	34
Referências Base Teórica .....	24
ARTIGO.....	35

## Abreviatura e Símbolos

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMPK	Adenosina Monofosfato
Akt	Proteína Quinase B fosforilada
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
GLUT4	Glucose Transporter isoforma 4
GLUTs	Transportadores de Glicose
LDL	Low Density Lipoprotein
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mRNA	RNA mensageiro
ER- $\alpha$	Receptor de Estrógeno $\alpha$
ER- $\beta$	Receptor de Estrógeno $\beta$
IRS	Substrato Receptor de Insulina
PI 3-quinase	Enzima Fosfatidil Inositol 3 Quinase
SGLT1	Proteína de transporte sódio-glicose
E2	Estradiol
mRNA	RNA Mensageiro
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B
HOMA-IR	Modelo de avaliação Homeostase
HDL	High Density Lipoprotein
KDa	Kilodaltons
SGLT	Co-transportador de glicose
UCP3	Proteína Desacopladora Mitocondrial
AMPK	Adenosina Monofosfato Quinase
NO	Óxido Nítrico
PKB	Proteína Quinase B
NGF	Fator de Crescimento de nervo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
PA	Pressão Arterial
PC	Pressão Cardíaca
PM	Membrana Plasmática
M	Microssomal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel dodecil-sulfato de sódio/poliacrilamida
E2 ou 17 $\beta$ Estradiol	Estradiol
PPAR $\gamma$	Receptores Ativados de Proliferador de Peroxissomo Gama



## **BASE TEÓRICA**

## 1 Introdução

Alimentação saudável é uma dieta equilibrada composta por todos os nutrientes necessários para a manutenção das funções fisiológicas do organismo. Classicamente, os nutrientes são divididos em macro e micronutrientes, água e as fibras. Os primeiros são compostos pelos carboidratos, incluindo as fibras, gorduras e proteínas, cuja função principal é fornecer energia para as demandas metabólicas, além de auxiliar na reconstrução celular. Já os micronutrientes, como as vitaminas e os minerais, a água regulam as reações químicas do organismo. Diariamente, esses nutrientes precisam ser ingeridos de forma a repor os gastos derivados da manutenção das funções fisiológicas. A falta de reposição ou o excesso desses nutrientes pode acarretar problemas à saúde (Vasconcellos, Recine *et al.*, 2006; Usda, 2010).

O papel de uma alimentação adequada é fornecer nutrientes para atender os requerimentos metabólicos e manter o indivíduo saudável. Porém, alguns tipos de alimentos e componentes alimentares específicos podem auxiliar as funções do organismo, como é o caso dos alimentos funcionais. Estes são entendidos como todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguros para consumo sem supervisão médica (Anvisa, 1999). Alguns exemplos de alimentos funcionais incluem alimentos ricos em vitaminas antioxidantes, fitoquímicos, probióticos, ácidos graxos essenciais e fibras (Fao, 2007; Hasler e Brown, 2009).

Os fitoquímicos são compostos derivados de plantas encontrados em frutas, legumes, feijões, cereais e outras plantas. Já foram identificados milhares de fitoquímicos, embora apenas uma pequena fração tenha sido estudada. Os polifenóis, são um grupo de compostos fitoquímicos que contêm em sua estrutura molecular anéis aromáticos de fenol ligados a uma ou mais hidroxilas. As principais classes de polifenóis são definidas de acordo com a natureza de seu esqueleto de carbono: ácidos fenólicos, flavonóides e os menos comuns estibenos e lignanos. Os flavonóides mais abundantes na nossa dieta são as flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, entre outras (Scalbert e Williamson, 2000; Manach, Scalbert *et al.*, 2004).

Os fitoestrógenos são um grupo diverso de compostos que mimetizam estrutural e funcionalmente os estrógenos de mamíferos. Os fitoestrógenos clássicos constituem um grupo de compostos derivados das plantas que inclui principalmente as isoflavonas (genisteína, daidzeína, gliciteína, formononetina), lignanos (secoisolariciresinol, matairesinol, pinoresinol, lariciresinol), coumestanos (coumestrol), estilbenos e o flavonóide quercetina (Clapauch, Meirelles *et al.*, 2002). Os alimentos com maior quantidade de fitoestrógenos totais são as nozes, sementes oleaginosas, derivados de soja, cereais, frutas e legumes (Thompson, Boucher *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação dos fitoestrógenos é complexo, via interação com os receptores nucleares para estrógeno, isoformas ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , exibindo ações que podem ser tanto agonistas como antagonistas em relação à ação dos estrógenos (Hwang, Kwak *et al.*, 2006). Sua ação biológica final, avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo* em animais e humanos, depende de múltiplos fatores, tais como a estrutura química do fitoestrógeno, tipo de tecido ou célula, estado estrogênico intrínseco, forma de administração, metabolismo, tempo e nível de exposição. Estes compostos caracterizam-se por especificidade tecidual elevada e atividade dose-dependente (Moutsatsou, 2007).

As isoflavonas são um dos tipos de fitoestrógenos mais estudados. Podem ser encontradas principalmente na soja e em seus derivados, tais como o queijo tofu, o missô, o leite e a farinha de

soja (Clapauch, Meirelles *et al.*, 2002). As isoflavonas mais estudadas são daidzeína, gliciteína e a genisteína (Pan, Xia *et al.*, 2007; Sosic-Jurjevic, Filipovic *et al.*, 2007). Mais recentemente tem havido interesse em estudar os metabólitos das isoflavonas, sendo o equol o principal metabólito da daidzeína, produzido via microflora específica do intestino. O equol tem meia vida prolongada e maior atividade biológica, incluindo atividade antioxidante superior aos fitoestrógenos de origem (Hwang, Kwak *et al.*, 2006). Embora a maioria dos animais produza equol a partir de daidzeína, 30-50% da população humana adulta não o faz, sugerindo que este possa ser o motivo pelo qual não se alcance os potenciais benefícios da soja mesmo quando é ingerida em quantidades potencialmente benéficas (Jackman, Woodman *et al.*, 2007; Tonetti, Zhang *et al.*, 2007). O fitoestrógeno genisteína tem se mostrado o mais eficaz em estudos experimentais e clínicos. Estudo *in vitro* comparou os efeitos do estradiol aos da genisteína e daidzeína sobre a proliferação celular (incorporação de [3H] Timidina) e síntese/degradação protéica (leucina radiomarcada) em células musculares de ratos. Os fitoestrógenos testados não interferiram na síntese/degradação protéica, mas a genisteína teve efeito semelhante ao do estradiol, inibindo a proliferação das células em concentrações  $\geq 1$  microM (Jones, Harty *et al.*, 2005).

Os efeitos dos fitoestrógenos sobre a saúde têm sido relatados como benéficos (efeitos anticarcinogênicos, cardioprotetores, de melhora na sensibilidade à insulina, como reposição hormonal da menopausa alternativa) (Peng, Clark *et al.*, 2005; Guan, Yeung *et al.*, 2006; Tempfer, Bentz *et al.*, 2007) ou deletérios (efeitos genotóxicos) (Di Virgilio, Iwami *et al.*, 2004; Klein e King, 2007; Tonetti, Zhang *et al.*, 2007), portanto, antes de serem empregados indiscriminadamente, mais estudos são necessários.

## 2 CLIMATÉRIO: FITOESTRÓGENOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a menopausa é definida como a interrupção da menstruação em consequência do término da produção de hormônios femininos e fim da ovulação (WHO 1990). As mulheres nesta fase da vida podem apresentar diversos sintomas, como fogachos, alterações urogenitais, osteoporose, além de terem aumentado seu risco para doenças cardiovasculares (Sowers e La Pietra, 1995). A reposição estrogênica para o tratamento destes sintomas já faz parte da prática clínica há bastante tempo (Who, 1990). No entanto, os efeitos adversos observados em ensaios clínicos de longa duração lançaram um alerta sobre o risco de seu uso (Hulley, Grady *et al.*, 1998; Herrington, Reboussin *et al.*, 2000; Rossouw, Anderson *et al.*, 2002). Considerando essas potenciais desvantagens, alternativas terapêuticas vêm sendo investigadas para o alívio destes sintomas, sendo os fitoestrógenos uma delas.

Um dos sintomas mais comuns em mulheres na menopausa são os fogachos. Os estudos realizados com fitoestrógenos mostraram alguma eficácia na redução desta sintomatologia. Ensaios clínicos randomizados e duplo cegos, realizados com mulheres na menopausa, que receberam tanto equol (Aso, Uchiyama *et al.*, 2011) como genisteína (D'anna, Cannata *et al.*, 2009; Evans, Elliott *et al.*, 2011) demonstraram uma redução no número de fogachos diários, em comparação com o grupo placebo. O tempo de exposição aos fitoestrógenos não pareceu influenciar na redução do número de fogachos, pois tanto os estudos com 3 e 12 meses de tratamento obtiveram resultados semelhantes.

Além dos sintomas vasoativos, as mulheres na menopausa também apresentam perda mineral óssea, podendo levar ao aumento da incidência de fraturas. Pesquisas que avaliaram o uso dos fitoestrógenos equol (Tousen, Ezaki *et al.*, 2011) e ipriflavolona (Zhang, Li *et al.*, 2010), mostraram uma redução na reabsorção da massa óssea. Estes estudos foram realizados com mulheres asiáticas, que possuem um consumo elevado de derivados da soja, o que poderia estar atuando como fator confundidor dos resultados, já que em estudo realizado com mulheres holandesas não se observou melhora desta variável (Kreijkamp-Kaspers, Kok *et al.*, 2004).

## **2.1 Estrógenos, Fitoestrógenos e Resistência Insulínica**

A resistência à insulina é caracterizada pela baixa capacidade dos tecidos insulino-sensíveis captarem a glicose, o que pode decorrer de defeitos nas vias de sinalização insulínica que regulam a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 ou no recrutamento de vesículas contendo esta proteína para a membrana plasmática, seu encaixe ou sua fusão com a membrana (Thorens, 1996a; White, 2003). A resistência à insulina é um fator importante na patogênese do diabetes e síndrome metabólica, além de estar associada com um risco aumentado de doença cardiovascular (Turner, Millns *et al.*, 1998; Isomaa, Almgren *et al.*, 2001; Mcfarlane, Banerji *et al.*, 2001; Eschwege, 2003; Rutter, Meigs *et al.*, 2005; Jeppesen, Hansen *et al.*, 2007; Jeppesen, Hansen *et al.*, 2008; Pencina, D'agostino *et al.*, 2009).

O tecido adiposo desempenha papel fundamental na resistência à insulina. Os ácidos graxos circulantes provenientes dos adipócitos por meio da lipólise estão elevados em muitos estados de resistência à insulina e tem sido sugerida sua participação na resistência à insulina do diabetes do tipo 2 e da obesidade pela inibição da captação de glicose, da síntese de glicogênio e da oxidação de glicose, e também da maior produção hepática de glicose (Boden e Shulman,

2002). A presença de elevados níveis de ácidos graxos livres circulantes também está associada à redução da fosforilação insulino-estimulada do IRS1 em tirosina e de sua associação com a PI3-quinase (Shulman, 2000). A ligação entre elevação dos ácidos graxos livres e resistência à insulina pode envolver o acúmulo de triglicérides e metabólitos derivados de ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) no músculo e fígado (Zechhin, Carvalheira *et al.*, 2004).

Os hormônios ovarianos possuem função operacional primária na reprodução e sabe-se que também influenciam a homeostase glicêmica, já que situações como as flutuações naturais de hormônios ovarianos do ciclo menstrual (Ezenwaka, Akanji *et al.*, 1993), gestação (Rushakoff, R. J. e Kalkhoff, R. K., 1981; Barros, R. P., Morani, A. *et al.*, 2008) e menopausa (Cagnacci, Soldani *et al.*, 1992b) determinam alterações do metabolismo da glicose.

É bem conhecido o efeito da gestação em induzir um estado de resistência à insulina, estimulando maior secreção de insulina, o que envolve aumento da massa das ilhotas pancreáticas e a sensibilidade das células  $\beta$  à glicose (Reece, Homko *et al.*, 1994). Entretanto, essa resposta compensatória muitas vezes não é suficiente para preservar a homeostasia glicêmica, surgindo o quadro clínico de diabetes gestacional. Em mulheres com diabetes prévio à gestação, a resistência insulínica durante a gestação piora seu controle glicêmico (Cousins, 1991). Além dos hormônios de origem placentária, que causam resistência à insulina, tem sido sugerido que altas concentrações de estrógenos, o que é característico da gestação, também podem ser causa de redução da sensibilidade à insulina (Livingstone e Collison, 2002).

Alternativas têm sido buscadas para a melhora deste quadro de resistência insulínica, porém, com resultados controversos. Em uma metanálise realizada com 10 ensaios clínicos randomizados que avaliavam o efeito de fitoestrógenos sobre o metabolismo da glicose, em um total de 794 mulheres não asiáticas na perimenopausa e na pós-menopausa, observou-se que a ingestão diária de doses de isoflavonas entre 40 e 120 mg não afetou os níveis séricos de glicose e insulinemia de jejum, apesar da grande variação do seu tipo e das dosagens de isoflavonas nestes

estudos. Contudo, quando comparado o efeito da genisteína isolada com placebo houve decréscimo na glicemia de jejum (Ricci, Cipriani *et al.*, 2010).



### 3 Estrógeno, Fitoestrógeno e GLUT4

GLUT4 é o chamado transportador de glicose insulino-sensível, cujo principal papel é proporcionar a captação de glicose mediada pela insulina no tecido adiposo e muscular, tecidos estes que expressam especificamente, mas não unicamente, a proteína GLUT4 (Gould e Holman, 1993). Modificações na expressão desta proteína nos tecidos adiposo e muscular esquelético associam-se diretamente com aumento ou redução da sensibilidade à insulina (Thorens, 1996). Nas células em repouso, o GLUT4 localiza-se principalmente no compartimento intracelular, representando em adipócitos até 95% do conteúdo celular total deste transportador (Rea 1997). A captação de glicose mediada por insulina no tecido muscular e adiposo é limitada pela expressão deste transportador (Rea e James, 1997). A insulina liga-se ao seu receptor e ativa uma cascata intracelular que culmina na translocação de vesículas contendo GLUT4 do citoplasma para a membrana celular, possibilitando a entrada de glicose na célula (Zhou, Chen *et al.*, 1999a). Esse mecanismo torna a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo dependente da transmissão do sinal insulínico, e alterações nessa via têm sido amplamente investigadas (Folli, Saad *et al.*, 1999).

O músculo cardíaco é caracterizado por uma alta taxa de consumo de glicose (Depre *et al.* 1999). Os cardiomiócitos expressam os transportadores GLUTs 1 e 4, este último mais importante do ponto de vista quantitativo neste tecido. Em cardiomiócitos isolados de ratos, a insulina agudamente estimula o transporte de glicose e translocação de GLUT4 do interior da célula para sua superfície, o que é limitado na sua ausência. A regulação da captação de glicose pode também

ser afetada pelas catecolaminas, serotonina, anóxia, isquemia e atividade contrátil muscular, regulação que se dá essencialmente através de aumento no deslocamento de GLUT4. Lactato e ácidos graxos livres podem inibir o transporte de glicose nos cardiomiócitos (Zorzano, Sevilla *et al.*, 1997). Mais recentemente, identificou-se que o SGLT1, um co-transportador de sódio e glicose, também é importante para a sua captação nos cardiomiócitos (Banerjee, McGaffin *et al.*, 2009).

Já foi demonstrado que o conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo branco diminui em mulheres grávidas saudáveis, e mais ainda naquelas com diabetes (Garvey, Maianu *et al.*, 1993; Okuno, Akazawa *et al.*, 1995). Em ratas se observou que no pós-parto, a resistência insulínica reverte rapidamente (Taylor e Davison, 2007) de maneira complexa, tempo e tecido-específica, e envolve uma fase de hipersensibilidade no tecido muscular esquelético (período inicial de lactação), durante a qual o GLUT4 não se altera neste território (Anhe, Hirabara *et al.*, 2007).

Em músculo esquelético, principal território de resistência insulínica (Zorzano, Santalucia *et al.*, 1998; Ryder, Gilbert *et al.*, 2001), a expressão de GLUT4 foi recentemente explorada por nosso grupo. Ratas ovariectomizadas mostraram ter aumento da sensibilidade insulínica, enquanto que o uso de 17- $\beta$ -estradiol (E2) por 7 dias nestas mesmas ratas diminuiu a sensibilidade à insulina. Estas alterações foram acompanhadas por mudanças na expressão de GLUT4 no músculo, sem modificação da mesma em tecido adiposo, sugerindo que o músculo tem papel chave na modulação da homeostase glicêmica induzida por E2. Da mesma forma, experimentos conduzidos *in vitro* mostraram que altas doses de E2 foram capazes de reduzir a expressão de GLUT4 (em 25%) em células L6 de forma dose e tempo-dependente. Já que o E2 regula a expressão de GLUT4 em músculo, reduzindo sua expressão quando utilizado em altas doses, como é o caso da gestação, conclui-se que o hiperestrogenismo da gestação pode estar relacionado ao estado de resistência à insulina característico desta situação (Barros, R. P., Morani, A. *et al.*, 2008).

No entanto, os efeitos dos hormônios ovarianos sobre a resistência à insulina e expressão de GLUT4 foram também estudados quando usados em doses fisiológicas. Um estudo com ratas avaliou o efeito da ovariectomia sobre o GLUT4 em tecidos muscular e adiposo, e mostrou não haver redução do transportador nesta circunstância, embora tenha sido avaliado apenas seu conteúdo total e não a translocação do mesmo. O estrógeno não alterou o transportador quando usado em doses fisiológicas e supra-fisiológicas, mas a progesterona sim. Este estudo se diferenciou de outros que avaliaram resistência à insulina em ratas ovariectomizadas pelo fato dos animais terem sua alimentação controlada, evitando ganho de peso associado, configurando, segundo os autores, fator de confusão neste tipo de avaliação (Campbell e Febbraio, 2002). No entanto, quando não se faz o controle da ração administrada às ratas ovariectomizadas, observa-se aumento de peso, de gordura visceral, piora da tolerância à glicose, *downregulation* de IRS-1, disfunção cardíaca e inflamação, fatores estes que são corrigidos pelo uso de doses fisiológicas de estrógeno (Kumagai, Holmang *et al.*, 1993; Gonzalez, Alonso *et al.*, 2001; Bruun, Nielsen *et al.*, 2003; Liu, Xu *et al.*, 2004) ou exercício físico (Saengsirisuwan, Pongseeda *et al.*, 2009). Os estudos foram diferentes também quando se considerou o tempo de ovariectomia.

Em mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos, também ocorre um estado de resistência à insulina, que se acompanha de redução no conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo, independentemente da presença de obesidade (Rosenbaum, Haber *et al.*, 1993). Estudo com mulheres diabéticas mostra que durante o ciclo menstrual, fase lútea, existe uma redução na sensibilidade à insulina (Escalante Pulido e Alpizar Salazar, 1999). Estas flutuações hormonais do ciclo menstrual, gestação e na síndrome dos ovários policísticos, sugerem que exista um hormônio de origem ovariana capaz de regular o GLUT4 e a sensibilidade insulínica.

Outros estudos evidenciaram que o E2 regula a expressão do mRNA do GLUT4 em células musculares L6 (em cultura) de forma complexa, sugerindo participação diferenciada dos receptores de estrógeno (ER)  $\alpha$  e  $\beta$  (Barros, 2004). A expressão do GLUT4 em camundongos

*knockout* para ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  e aromatase (esse último, sem produção endógena de estrógeno) revelou que o ER- $\alpha$  é um estimulador, enquanto que o ER- $\beta$  é um supressor do gene do GLUT4 (Barros, Machado e Gustafsson, 2006; Barros, Machado, Warner *et al.*, 2006). Estes estudos evidenciaram que os estrógenos desempenham um papel fisiológico na regulação da homeostasia glicêmica mesmo em machos. É possível que a modulação da expressão de GLUT4 induzida por E2 em células L6, que é dose e tempo-dependente, seja determinada por mudança na expressão e/ou atividade dos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Já foi demonstrado efeito tempo (Jeng, Shupnik *et al.*, 1998) e dose-dependente (Varayoud, Ramos *et al.*, 2005) do E2 sobre a expressão de ERs. Além disso, foi mostrado que a atividade dos ERs sobre a transcrição de genes alvo inicia com efeitos de E2 em doses baixas através de ação sobre ER $\alpha$ , enquanto que a ação sobre ER $\beta$  ocorre sob efeito de altas concentrações do hormônio (Hall e McDonnell, 1999). Portanto, baixas concentrações de E2 poderiam estar causando predominantemente um aumento do efeito dependente de ER $\alpha$  sobre o GLUT4.

Como os ERs alteram a expressão de GLUT4 não se sabe. É possível que os ERs possam interagir com outros fatores transcricionais, tais como o NF-kB (Galien e Garcia, 1997), que os próprios receptores estejam agindo como fatores transcricionais ou que ocorram efeitos não-genômicos determinados pelo E2, como já descrito (Santen, Song *et al.*, 2005).

Evidências recentes têm sugerido efeito benéfico dos fitoestrógenos na obesidade e diabetes. Estudos de intervenção nutricional em animais (Lavigne, Marette *et al.*, 2000) e humanos (Tsai, Mott *et al.*, 1983; Tsai, Vinik *et al.*, 1987) mostraram que a ingestão de proteína da soja pode melhorar o controle glicêmico e reduzir a resistência à insulina. Há, no entanto, estudos que não comprovam estes efeitos benéficos (Hall, Vafeiadou *et al.*, 2006). Não se sabe, ainda, se os possíveis efeitos benéficos da soja se devem à ingestão de isoflavonas (daidzeína e genisteína), lignanos (matairesinol e secoisolariciresinol), ou outro componente. Especificamente os lignanos são encontrados em grande quantidade na linhaça (Clapauch, Meirelles *et al.*, 2002).

As isoflavonas poderiam ter estes efeitos benéficos por modular a secreção de insulina pelo pâncreas, através de suas ações antioxidantes ou por mecanismos via ERs (Bhathena e Velasquez, 2002). Ensaio clínico randomizado em mulheres pós-menopáusicas mostrou efeitos benéficos da genisteína *vs* placebo em reduzir fibrinogênio, glicemia e insulinemia de jejum e também a resistência insulínica avaliada pelo HOMA-IR, todos potenciais efeitos cardiovasculares benéficos (Crisafulli, Altavilla *et al.*, 2005). Interessante observar que, embora sem efeitos benéficos no grupo de mulheres pós-menopáusicas avaliado na sua totalidade, o uso de soja elevou o HDL-colesterol naquelas com genótipo ER $\beta$  (cx) *Tsp509I*, sugerindo que um subgrupo de mulheres possa ter benefício com o uso de fitoestrógenos, o que estaria ligado a variações no gene do ER $\beta$  (Hall, Vafeiadou *et al.*, 2006).

Maior sensibilidade à insulina foi observada em ratos alimentados com dieta a base de proteína de soja *vs.* animais alimentados a base de caseína (Sugano, Ishiwaki *et al.*, 1982), resultados que foram atribuídos a uma proteína de 37-kDa da soja, que mostrou modular a ação da insulina em estudos *in vitro* (Minami, Moriyama *et al.*, 1990). Em ratos (Taha e Wasif, 1996) e humanos (Tsai, Vinik *et al.*, 1987) com diabetes tipo 2 observou-se resultados semelhantes. No entanto, não é claro se os efeitos benéficos sobre o metabolismo da glicose e lipídios se devam à proteína da soja, isoflavonas ou fibras, já que dietas ricas em fibras podem trazer benefícios semelhantes.

O uso de um extrato de soja contendo as isoflavonas genisteína e daidzeína foi investigado *in vitro*, mostrando efeito protetor à oxidação do LDL. O equol teve efeito antioxidante melhor do que a genisteína e a daidzeína, e foi semelhante ao E2. Em vesículas de borda em escova de intestino de coelhos o extrato de soja mostrou-se capaz de inibir a captação de glicose, embora menos potente do que a florizina, um clássico inibidor do SGLT (Vedavanam, Srijayanta *et al.*, 1999). No entanto, em células musculares lisas que foram transfectadas com UCP3 *in vitro*, o aumento da captação de glicose e da expressão de GLUT4 na membrana celular determinado pela

hiperexpressão desta proteína, foi abolido pelo uso de genisteína (Huppertz, Fischer *et al.*, 2001), e em adipócitos *in vitro* a genisteína inibe diretamente a captação de glicose (Bazuine, Van Den Broek *et al.*, 2005; Nomura, Takahashi *et al.*, 2008). Foi demonstrado recentemente, que a genisteína não aumentou a expressão do GLUT4 no músculo cardíaco bem como os níveis séricos de glicose em ratas ovariectomizadas (Al-Nakkash, Markus *et al.*, 2010). A investigação do uso de derivados de genisteína em miotubos *in vitro* mostrou ser capaz de aumentar a captação de glicose, fosforilação de AMPK e maior expressão de GLUT1 e GLUT4 (Lee, Kim *et al.*, 2009). Estudo em corações de ratas ovariectomizadas mostraram redução de óxido nítrico e expressão de NO sintase endotelial (eNOS) no tecido miocárdico, efeitos que foram revertidos com a suplementação de 17- $\beta$ -estradiol ou genisteína, com menor para-efeito desta última sobre o sistema reprodutor (Tang, Wang *et al.*, 2005). Agudamente, o aumento de eNOS pelo estrógeno se dá pela via Akt/PKB, o que se associa à melhora da função endotelial (Florian, Lu *et al.*, 2004), o que também foi visto cronicamente (Stirone, Boroujerdi *et al.*, 2005).

Estudo com ratos diabéticos tratados com genisteína mostrou eficácia deste tratamento na melhora das complicações do diabetes. A genisteína reduziu neuropatia periférica, o estresse oxidativo e restaurou o conteúdo de nerve growth factor (NGF) no nervo ciático e de iNOS/eNOS na aorta torácica. O uso deste fitoestrógeno poderia servir como terapia alternativa às complicações do diabetes (Valsecchi, Franchi *et al.*, 2010).

Os mecanismos de ação dos fitoestrógenos podem ser relacionados à sua semelhança estrutural com os estrógenos. Os fitoestrógenos agem como estrógenos fracos, competindo com o E2 pela ligação aos receptores nucleares, e modulando seus efeitos transcricionais (Martin, Horwitz *et al.*, 1978). Já foi mostrado que os fitoestrógenos se ligam aos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ , o que poderia ocorrer com maior eficiência no ER $\beta$  (Kuiper, Lemmen *et al.*, 1998). Os fitoestrógenos podem também exercer seus efeitos por mecanismos não relacionados aos receptores, por inibir a atividade de várias enzimas envolvidas na sinalização celular (Linassier,

Pierre *et al.*, 1990), por modificar eventos como proliferação e diferenciação celulares (Jones, Harty *et al.*, 2005) e por efeitos antioxidantes (Vedavanam, Sriyayanta *et al.*, 1999).

## Referências Base Teórica

- Al-Nakkash, L., B. Markus, et al. (2010). "Genistein Induces Estrogen-Like Effects in Ovariectomized Rats but Fails to Increase Cardiac GLUT4 and Oxidative Stress." Journal of Medicinal Food **13**(6): 1369-1375.
- Anhe, G. F., S. M. Hirabara, et al. (2007). "Postpartum glycemic homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(6): R2225-33.
- ANVISA (1999). "Portaria N° 398, de 30 de abril de 1999."
- Aso, T., S. Uchiyama, et al. (2011). "A Natural S(-) Equol Supplement Alleviates Hot Flushes and Other Menopausal Symptoms in Equol Nonproducing Postmenopausal Japanese Women." Journal of Women's Health **20**.
- Banerjee, S. K., K. R. McGaffin, et al. (2009). "SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states." Cardiovasc Res **84**(1): 111-8.
- Barros, R. P., U. F. Machado, et al. (2006). "Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus." Trends Mol Med **12**(9): 425-31.
- Barros, R. P., U. F. Machado, et al. (2006). "Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1605-8.
- Barros, R. P., Machado, U.F. (2004). "Efeitos do 17-beta-estradiol na expressão do mRNA do GLUT4 em células musculares da linhagem L6." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia **48**(Supl 1): S141-S141.
- Barros, R. P., A. Morani, et al. (2008). "Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4." Mol Cell Endocrinol **295**(1-2): 24-31.
- Bazuine, M., P. J. van den Broek, et al. (2005). "Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **326**(2): 511-4.
- Bhathena, S. J. and M. T. Velasquez (2002). "Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes." Am J Clin Nutr **76**(6): 1191-201.



- Boden, G. and G. Shulman (2002). "Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction." European Journal of Clinical Investigation **32**: 14-23.
- Bruun, J. M., C. B. Nielsen, et al. (2003). "Estrogen reduces pro-inflammatory cytokines in rodent adipose tissue: studies in vivo and in vitro." Horm Metab Res **35**(3): 142-6.
- Cagnacci, A., R. Soldani, et al. (1992). "Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women." J Clin Endocrinol Metab **74**(6): 1396-400.
- Campbell, S. E. and M. A. Febbraio (2002). "Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(5): E1139-46.
- Clapauch, R., R. M. Meirelles, et al. (2002). "Phytoestrogens: Position of the Department of Female Endocrinology of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia **46**(6): 679-695.
- Cousins, L. (1991). "Insulin sensitivity in pregnancy." Diabetes **40 Suppl 2**: 39-43.
- Crisafulli, A., D. Altavilla, et al. (2005). "Effects of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women." Menopause **12**(2): 186-92.
- D'Anna, R., M. L. Cannata, et al. (2009). "Effects of the phytoestrogen genistein on hot flushes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, placebo-controlled study." Menopause **16**(2): 301.
- Di Virgilio, A. L., K. Iwami, et al. (2004). "Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells." Toxicol Lett **151**(1): 151-62.
- Escalante Pulido, J. M. and M. Alpizar Salazar (1999). "Changes in insulin sensitivity, secretion and glucose effectiveness during menstrual cycle." Arch Med Res **30**(1): 19-22.
- Eschwege, E. (2003). "The dysmetabolic syndrome, insulin resistance and increased cardiovascular (CV) morbidity and mortality in type 2 diabetes: aetiological factors in the development of CV complications." Diabetes & metabolism **29**(4): 6S19-6S27.
- Evans, M., J. G. Elliott, et al. (2011). "The effect of synthetic genistein on menopause symptom management in healthy postmenopausal women: a multi-center, randomized, placebo-controlled study." Maturitas **68**(2): 189-96.
- Ezenwaka, E. C., A. O. Akanji, et al. (1993). "Insulin responses following glucose administration in menstruating women." Int J Gynaecol Obstet **42**(2): 155-9.
- FAO (2007). "Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Reports on Functional foods".

- Florian, M., Y. Lu, et al. (2004). "Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation." Steroids **69**(10): 637-45.
- Folli, F., M. J. Saad, et al. (1999). "Crosstalk between insulin and angiotensin II signalling systems." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(2): 133-9.
- Galien, R. and T. Garcia (1997). "Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site." Nucleic Acids Res **25**(12): 2424-9.
- Garvey, W. T., L. Maianu, et al. (1993). "Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes. Heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters." Diabetes **42**(12): 1773-85.
- Gonzalez, C., A. Alonso, et al. (2001). "Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on insulin receptor substrate-1." Jop **2**(4): 140-9.
- Gould, G. W. and G. D. Holman (1993). "The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression." Biochem J **295** ( Pt 2): 329-41.
- Guan, L., S. Y. Yeung, et al. (2006). "Both soybean and kudzu phytoestrogens modify favorably the blood lipoprotein profile in ovariectomized and castrated hamsters." J Agric Food Chem **54**(13): 4907-12.
- Hall, J. M. and D. P. McDonnell (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." Endocrinology **140**(12): 5566-78.
- Hall, W. L., K. Vafeiadou, et al. (2006). "Soy-isoflavone-enriched foods and markers of lipid and glucose metabolism in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production." Am J Clin Nutr **83**(3): 592-600.
- Hasler, C. and A. Brown (2009). "Position of the American Dietetic Association: functional foods." Journal of the American Dietetic Association **109**(4): 735.
- Herrington, D. M., D. M. Reboussin, et al. (2000). "Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis." N Engl J Med **343**(8): 522-9.
- Hulley, S., D. Grady, et al. (1998). "Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group." JAMA **280**(7): 605-13.
- Huppertz, C., B. M. Fischer, et al. (2001). "Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism." J Biol Chem **276**(16): 12520-9.

- Hwang, C. S., H. S. Kwak, et al. (2006). "Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration." J Steroid Biochem Mol Biol **101**(4-5): 246-53.
- Isomaa, B., P. Almgren, et al. (2001). "Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome." Diabetes care **24**(4): 683.
- Jackman, K. A., O. L. Woodman, et al. (2007). "Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights." Curr Med Chem **14**(26): 2824-30.
- Jeng, M. H., M. A. Shupnik, et al. (1998). "Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells." Endocrinology **139**(10): 4164-74.
- Jeppesen, J., T. W. Hansen, et al. (2008). "C-reactive protein, insulin resistance and risk of cardiovascular disease: a population-based study." European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation **15**(5): 594.
- Jeppesen, J., T. W. Hansen, et al. (2007). "Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease: a population-based study." Journal of the American College of Cardiology **49**(21): 2112-2119.
- Jones, K. L., J. Harty, et al. (2005). "In vitro effects of soy phytoestrogens on rat L6 skeletal muscle cells." J Med Food **8**(3): 327-31.
- Klein, C. B. and A. A. King (2007). "Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose." Toxicol Appl Pharmacol **224**(1): 1-11.
- Kreijkamp-Kaspers, S., L. Kok, et al. (2004). "Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial." JAMA **292**(1): 65-74.
- Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, et al. (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta." Endocrinology **139**(10): 4252-63.
- Kumagai, S., A. Holmang, et al. (1993). "The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats." Acta Physiol Scand **149**(1): 91-7.
- Lavigne, C., A. Marette, et al. (2000). "Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(3): E491-500.
- Lee, M. S., C. H. Kim, et al. (2009). "Genistein-derivatives from *Tetracera scandens* stimulate glucose-uptake in L6 myotubes." Biol Pharm Bull **32**(3): 504-8.
- Linassier, C., M. Pierre, et al. (1990). "Mechanisms of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity." Biochem Pharmacol **39**(1): 187-93.

- Liu, M. L., X. Xu, et al. (2004). "Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function." Int J Cardiol **97**(3): 485-93.
- Livingstone, C. and M. Collison (2002). "Sex steroids and insulin resistance." Clin Sci (Lond) **102**(2): 151-66.
- Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." The American journal of clinical nutrition **79**(5): 727.
- Martin, P. M., K. B. Horwitz, et al. (1978). "Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells." Endocrinology **103**(5): 1860-7.
- McFarlane, S. I., M. Banerji, et al. (2001). "Insulin resistance and cardiovascular disease." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **86**(2): 713.
- Minami, K., R. Moriyama, et al. (1990). "Identification of soybean protein components that modulate the action of insulin in vitro." Agric Biol Chem **54**(2): 511-7.
- Moutsatsou, P. (2007). "The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding." Hormones (Athens) **6**(3): 173-93.
- Nomura, M., T. Takahashi, et al. (2008). "Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells." Biol Pharm Bull **31**(7): 1403-9.
- Okuno, S., S. Akazawa, et al. (1995). "Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy." Horm Metab Res **27**(5): 231-4.
- Pan, L., X. Xia, et al. (2007). "Exposure to the phytoestrogen daidzein attenuates apomorphine-induced penile erection concomitant with plasma testosterone level reduction in dose- and time-related manner in adult rats." Urology **70**(3): 613-7.
- Pencina, M. J., R. B. D'Agostino, et al. (2009). "Predicting the 30-Year Risk of Cardiovascular Disease." Circulation **119**(24): 3078-3084.
- Peng, N., J. T. Clark, et al. (2005). "Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289**(3): R771-5.
- Rea, S. and D. E. James (1997). "Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles." Diabetes **46**(11): 1667-77.
- Reece, E. A., C. Homko, et al. (1994). "Metabolic changes in diabetic and nondiabetic subjects during pregnancy." Obstet Gynecol Surv **49**(1): 64-71.

- Ricci, E., S. Cipriani, et al. (2010). "Effects of soy isoflavones and genistein on glucose metabolism in perimenopausal and postmenopausal non-Asian women: a meta-analysis of randomized controlled trials." Menopause **17**(5): 1080-6.
- Rosenbaum, D., R. S. Haber, et al. (1993). "Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes." Am J Physiol **264**(2 Pt 1): E197-202.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." JAMA **288**(3): 321-33.
- Rushakoff, R. J. and R. K. Kalkhoff (1981). "Effects of pregnancy and sex steroid administration on skeletal muscle metabolism in the rat." Diabetes **30**(7): 545-50.
- Rutter, M. K., J. B. Meigs, et al. (2005). "Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study." Diabetes **54**(11): 3252.
- Ryder, J. W., M. Gilbert, et al. (2001). "Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations." Front Biosci **6**: D154-63.
- Saengsirisuwan, V., S. Pongseeda, et al. (2009). "Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement." Metabolism **58**(1): 38-47.
- Santen, R. J., R. X. Song, et al. (2005). "Long-term estradiol deprivation in breast cancer cells up-regulates growth factor signaling and enhances estrogen sensitivity." Endocr Relat Cancer **12 Suppl 1**: S61-73.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." J Nutr **130**(8S Suppl): 2073S-85S.
- Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." Journal of Clinical Investigation **106**(2): 171-176.
- Sosic-Jurjevic, B., B. Filipovic, et al. (2007). "Subcutaneously administrated genistein and daidzein decrease serum cholesterol and increase triglyceride levels in male middle-aged rats." Exp Biol Med (Maywood) **232**(9): 1222-7.
- Sowers, M. and M. T. La Pietra (1995). "Menopause: its epidemiology and potential association with chronic diseases." Epidemiologic reviews **17**(2): 287.
- Stirone, C., A. Boroujerdi, et al. (2005). "Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects." Mol Pharmacol **67**(1): 105-13.

- Sugano, M., N. Ishiwaki, et al. (1982). "Effects of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats." Br J Nutr **48**(2): 211-21.
- Taha, S. A. and M. M. Wasif (1996). "Hypoglycemic effect and protein nutritive quality of soy and methionine-supplemented whole durum pasta products." Nahrung **40**(5): 281-7.
- Tang, Y. B., Q. L. Wang, et al. (2005). "Phytoestrogen genistein supplementation increases eNOS and decreases caveolin-1 expression in ovariectomized rat hearts." Sheng Li Xue Bao **57**(3): 373-8.
- Taylor, R. and J. M. Davison (2007). "Type 1 diabetes and pregnancy." Bmj **334**(7596): 742-5.
- Tempfer, C. B., E. K. Bentz, et al. (2007). "Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature." Fertil Steril **87**(6): 1243-9.
- Thompson, L. U., B. A. Boucher, et al. (2006). "Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol." Nutr Cancer **54**(2): 184-201.
- Thorens, B. (1996). "Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes." Am J Physiol **270**(4 Pt 1): G541-53.
- Thorens, B. (1996). "Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **270**(4): G541-G553.
- Tonetti, D. A., Y. Zhang, et al. (2007). "The effect of the phytoestrogens genistein, daidzein, and equol on the growth of tamoxifen-resistant T47D/PKC alpha." Nutr Cancer **58**(2): 222-9.
- Tousen, Y., J. Ezaki, et al. (2011). "Natural S-equol decreases bone resorption in postmenopausal, non-equol-producing Japanese women: a pilot randomized, placebo-controlled trial." Menopause **18**(5): 563.
- Tsai, A. C., E. L. Mott, et al. (1983). "Effects of soy polysaccharide on gastrointestinal functions, nutrient balance, steroid excretions, glucose tolerance, serum lipids, and other parameters in humans." Am J Clin Nutr **38**(4): 504-11.
- Tsai, A. C., A. I. Vinik, et al. (1987). "Effects of soy polysaccharide on postprandial plasma glucose, insulin, glucagon, pancreatic polypeptide, somatostatin, and triglyceride in obese diabetic patients." Am J Clin Nutr **45**(3): 596-601.
- Turner, R., H. Millns, et al. (1998). "Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23)." Bmj **316**(7134): 823-828.
- USDA (2010). "US Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans."

- Valsecchi, A. E., S. Franchi, et al. (2010). "The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model." European journal of pharmacology **650**(2): 694-702.
- Varayoud, J., J. G. Ramos, et al. (2005). "The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus." J Endocrinol **186**(1): 51-60.
- Vasconcellos, A. B., E. Recine, et al. (2006). Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília, Ministério da Saúde Brasília.
- Vedavanam, K., S. Sriyanta, et al. (1999). "Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE)." Phytother Res **13**(7): 601-8.
- White, M. F. (2003). "Insulin signaling in health and disease." Science **302**(5651): 1710.
- WHO (1990). "Research on the Menopause." WHO Library Cataloguing in Publication Date.
- Zechin, H., J. B. C. Carvalheira, et al. (2004). "Mecanismos moleculares da resistência a insulina na síndrome metabólica." Rev Soc Cardiol Est de São Paulo **14**: 574-89.
- Zhang, X., S. W. Li, et al. (2010). "Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis." Gynecological Endocrinology **26**(2): 76-80.
- Zhou, L., H. Chen, et al. (1999). "Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells." Mol Endocrinol **13**(3): 505-14.
- Zorzano, A., T. Santalucia, et al. (1998). "Searching for ways to upregulate GLUT4 glucose transporter expression in muscle." Gen Pharmacol **31**(5): 705-13.
- Zorzano, A., L. Sevilla, et al. (1997). "Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes." Am J Cardiol **80**(3A): 65A-76A.

#### 4 Justificativa

Isoflavonas e lignanos são encontrados em abundância na soja e linhaça, respectivamente, e são frequentemente prescritos informalmente a mulheres no climatério com a idéia de se obter reversão de alterações fisiopatológicas características deste período e benefícios metabólicos e cardiovasculares, assim como a prescrição de reposição hormonal da menopausa com estrógenos. A interferência da função ovariana na sensibilidade à insulina é bem conhecida. Neste sentido, a participação dos estrógenos tem sido sugerida a partir da observação de várias situações fisiológicas e/ou fisiopatológicas, entretanto os mecanismos envolvidos ainda não estão plenamente estabelecidos. Portanto mais estudos são necessários para o entendimento da ação destes hormônios. Adicionalmente, não há estudos quanto aos efeitos dos lignanos sobre a sensibilidade à insulina e dos fitoestrógenos, soja e linhaça, sobre a expressão de transportadores de glicose (tecido adiposo, coração e músculo esquelético) *in vivo*, assim como é de interesse comparar estes efeitos aos do 17- $\beta$ -estradiol usado em doses fisiológicas.



## **5 Hipótese**

O uso de 17  $\beta$ -estradiol em doses fisiológicas e dos fitoestrógenos, da soja e da linhaça, poderiam melhorar a sensibilidade insulínica e aumentar o transporte de glicose no tecido adiposo, coração e músculo esquelético.

## **6 Objetivos**

### **6.1 Geral**

Investigar, *in vivo*, o efeito de estradiol (níveis fisiológicos) e fitoestrógenos (isoflavonas – semente de soja e lignanos – linhaça) sobre a sensibilidade insulínica, expressão de transportadores de glicose GLUT4 em tecido adiposo, coração e músculo esquelético de ratas ovariectomizadas.

### **6.2 Específicos**

1. Avaliar a sensibilidade insulínica após 21 dias de tratamento com  $17\beta$ -estradiol, linhaça e soja;
2. Analisar a pressão arterial e frequência cardíaca dos animais após os tratamentos;
3. Analisar o perfil lipídico após os tratamentos;
4. Quantificar o conteúdo de Glut4 na membrana plasmática e fração microsomal do tecido adiposo, coração e músculo gastrocnêmio.

**ARTIGO**

IMPACTO DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL E FITOESTRÓGENOS NA  
SENSIBILIDADE INSULÍNICA E GLUT4 EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Luciana Pereira Dresseno<sup>1,2</sup>, Alexandre Machado Lehnen<sup>1,2</sup>, Ariel Silveira<sup>2</sup>, Melissa Medeiros  
Markoski<sup>2</sup>, Ubiratan Fabres Machado<sup>3</sup>, Beatriz D'Agord Schaan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Endocrinologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia do Rio Grande do Sul (RS), Brasil

<sup>3</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

**Endereço para correspondência:**

Dra. Beatriz D'Agord Schaan

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: 55 51 33310207 – E-mail: [beatrizschaan@gmail.com](mailto:beatrizschaan@gmail.com)

## RESUMO

### Impacto do Tratamento com Estradiol e Fitoestrógenos na Sensibilidade Insulínica e Glut4 em Ratas Ovariectomizadas

Luciana Pereira Dresseno, Alexandre Machado Lehen, Ariel Silveira, Melissa Medeiros Markoski, Ubiratan Fabres Machado, Beatriz D'Agord Schaan

**Introdução:** O uso de estrógeno é comumente recomendável no período do climatério. Entretanto, o estrógeno pode trazer eventos adversos. Assim, o uso de fitoestrógenos vem sendo estudado como tratamento alternativo à reposição estrogênica. **Objetivo:** Avaliar, *in vivo*, o efeito de estradiol e fitoestrógenos sobre parâmetros hemodinâmicos, perfil lipídico, sensibilidade insulínica e GLUT4 em ratas ovariectomizadas. **Métodos:** 44 ratas Wistar com 90 dias de idade sofreram ovariectomia. Após vinte e um dias, foram divididas em 4 grupos: C (ovariectomizadas tratadas com dieta padrão), E (ovariectomizadas tratadas com dieta padrão e inserção de *pellet* subcutâneo com 17 $\beta$ -estradiol), L (ovariectomizadas tratadas com dieta padrão com adição de proteína de farinha de linhaça e inserção de *pellet* subcutâneo placebo) e S (ovariectomizadas tratadas com dieta com adição de proteína de soja e inserção de *pellet* subcutâneo placebo). A intervenção dietética ocorreu por 21 dias, após alocação dos grupos. Ao final do estudo foi realizado o teste de tolerância insulínica (kITT), registrado a pressão arterial, coletado sangue, para análise do colesterol total (CT), colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos, por teste imunoenzimático, e coletado o coração, tecido adiposo e músculo esquelético (gastrocnêmio) para análise da expressão do GLUT4 por *Western blot*. **Resultados:** O grupo E apresentou menor peso corporal e índice de Lee, em relação grupo C ( $p=0,002$  e  $p<0,001$ , respectivamente). Houve tendência de melhora na sensibilidade insulínica do grupo S em relação aos demais grupos, embora sem significância estatística ( $p=0,064$ ). O uso do estrógeno determinou aumento do peso do útero aproximadamente 3 vezes em relação aos demais grupos ( $p<0,001$ ). Os parâmetros hemodinâmicos não se mostraram alterados em nenhum dos grupos estudados. Os grupos L (~28%,  $p=0,037$ ) e S (~35%,  $p=0,011$ ) mostraram menores níveis de CT em relação ao grupo C. Também foi observada redução no LDL em comparação ao grupo C (L: ~40%,  $p=0,031$  e S: ~56%,  $p=0,003$ ). Não houve alteração nos níveis de HDL dos animais estudados. Os triglicerídeos mostraram-se reduzidos no grupo L (~60%,  $p=0,036$ ) e no grupo S (~71%,  $p=0,014$ ), comparados ao grupo C. A expressão do GLUT4, na fração microssomal do tecido adiposo, foi maior nos grupos E e L ( $p=0,030$  e  $p=0,019$ , respectivamente), bem como na membrana plasmática dos grupos E, L e S (E: 102%,  $p<0,001$ ; L: 92%,  $p=0,011$ ; S: 81%,  $p=0,020$ ), comparados ao grupo C. No coração, houve aumento do GLUT4 na fração microssomal do grupo L (~78%,  $p<0,001$ ); já na membrana plasmática, o GLUT4 se mostrou elevado nos grupos E, L e S ( $p=0,026$ ;  $p=0,001$ ;  $p=0,040$  respectivamente), quando comparados ao grupo C. Não houve alteração do GLUT4 no gastrocnêmio ao longo do estudo. **Conclusão:** As intervenções dietéticas linhaça e soja promoveram redução do colesterol total, LDL e triglicerídeos e não modificou os dados hemodinâmicos. Tanto o uso do estrógeno, como da linhaça e soja aumentaram a expressão de GLUT4, especialmente no tecido adiposo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estradiol; Linhaça; Soja; Fitoestrógenos; Resistência Insulínica; GLUT4;

Ovariectomia; Ratas.

## ABSTRACT

**Introduction:** The use of estrogen is usually recommended during the climacteric period. However, estrogen can cause some side effects. Thus, the use of phytoestrogens has been studied as an alternative treatment to estrogen replacement. **Objective:** To evaluate *in vivo* the effect of estradiol and phytoestrogens on the hemodynamic parameters, lipid profile, insulin sensitivity and GLUT4 in ovariectomized rats. **Methods:** 44 Wistar rats 90 days old underwent ovariectomy. After twenty-one days, were divided into 4 groups: C (ovariectomized treated with standard diet), E (ovariectomized treated with standard diet and inserting pellet subcutaneously with 17 $\beta$ -estradiol), L (ovariectomized treated with standard diet with added protein flaxseed meal and insertion of subcutaneous pellet placebo) and S (ovariectomized treated with diet with soybean protein and insertion of subcutaneous pellet placebo). The dietary intervention occurred 21 days after allocation of the groups. At the end of the study was performed insulin tolerance test (Kitt), recorded blood pressure, blood collected for analysis of total cholesterol (TC), LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides by enzyme immunoassay, and collected the heart tissue fat and skeletal muscle (gastrocnemius) for GLUT4 expression analysis by Western blot. **Results:** The E group had lower body weight and Lee index, when compared to group C ( $p = 0.002$  and  $p < 0.001$ , respectively). There was a trend of improvement in insulin sensitivity of the S group compared to other groups, although not statistically significant ( $p = 0.064$ ). The use of estrogen resulted in an increase in uterine weight approximately three times compared to other groups ( $p < 0.001$ ). Hemodynamic parameters were not altered in any group. The groups L (~ 28%,  $p = 0.037$ ) and S (~ 35%,  $p = 0.011$ ) showed lower levels of CT compared to group C. It was also observed reduction in LDL compared to group C (L: ~ 40%,  $p = 0.031$  and S: ~ 56%,  $p = 0.003$ ). There were no changes in HDL levels in the animals studied. Triglycerides were shown to be reduced in group L (~ 60%,  $p = 0.036$ ) and Group S (~ 71%,  $p = 0.014$ ) as compared to group C. The GLUT4 expression in the microsomal fraction of adipose tissue, was higher in Groups E and G ( $p = 0.030$  and  $p = 0.019$  respectively) and in the plasma membrane of the groups E, L and S (E: 102%,  $p < 0.001$ , L: 92%,  $p = 0.011$ , S: 81%,  $p = 0.020$ ) as compared to group C. In the heart, increased GLUT4 in the microsomal fraction of the group L (~ 78%,  $p < 0.001$ ), while in the plasma membrane, GLUT4 was higher in groups E, L and S ( $p = 0.026$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.040$  respectively) when compared to group C. There was no change in GLUT4 in the gastrocnemius during the study. **Conclusion:** The intervention promoted dietary soy and flaxseed reduced total cholesterol, LDL and triglycerides and did not modify the hemodynamic data. Both the use of estrogen as the linseed and soybean increased GLUT4 expression, especially in adipose tissue.

**KEY WORDS:** Estradiol; Flaxseed; Soy; Phytoestrogens; Insulin Resistance; GLUT4;

Ovariectomy; Rats.

## INTRODUÇÃO

Menopausa é definida como a interrupção da menstruação em consequência do término da produção de hormônios femininos, estrógeno e progesterona, e o fim da ovulação (WHO 1990). As mulheres nesta fase da vida podem apresentar diversos sintomas, como fogachos, alterações urogenitais e osteoporose. Os estrógenos em doses fisiológicas influenciam a homeostase glicêmica e situações como as flutuações naturais destes hormônios do ciclo menstrual (Ezenwaka, Akanji *et al.*, 1993), gestação (Rushakoff, R. J. e Kalkhoff, R. K., 1981; Barros, R. P., Morani, A. *et al.*, 2008) e menopausa (Cagnacci, Soldani *et al.*, 1992b) podem determinar alterações do metabolismo da glicose.

A reposição estrogênica para o tratamento dos sintomas do climatério já faz parte da prática clínica há muito tempo (Who, 1990). No entanto, efeitos adversos, como eventos tromboembólicos, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e câncer de mama, observados em ensaios clínicos de longa duração lançaram um alerta sobre o risco de seu uso (Hulley, Grady *et al.*, 1998; Herrington, Reboussin *et al.*, 2000; Rossouw, Anderson *et al.*, 2002). Considerando essas potenciais desvantagens, outras alternativas terapêuticas vêm sendo investigadas para o alívio destes sintomas, sendo os fitoestrógenos uma delas.

Os fitoestrógenos são um grupo diverso de compostos que mimetizam estrutural e funcionalmente os estrógenos de mamíferos. Os fitoestrógenos mais estudados são as isoflavonas da soja (genisteína, daidzeína, gliciteína) e os lignanos da linhaça (secoisolariciresinol). Os efeitos dos fitoestrógenos sobre a saúde têm sido relatados como benéficos (efeitos anticarcinogênicos, cardioprotetores, melhora na sensibilidade à insulina, reversão de alguns sintomas da menopausa) (Peng, Clark *et al.*, 2005; Guan, Yeung *et al.*, 2006; Tempfer, Bentz *et al.*, 2007) ou deletérios (efeitos genotóxicos) (Di Virgilio, Iwami *et al.*, 2004; Klein e King, 2007; Tonetti, Zhang *et al.*, 2007).

Os fitoestrógenos poderiam contribuir para a melhora deste quadro de resistência insulínica, porém, muitos resultados são controversos. Em revisão sistemática com metanálise realizada com 10 ensaios clínicos randomizados que avaliavam o efeito de fitoestrógenos sobre o metabolismo da glicose, em um total de 794 mulheres não asiáticas na perimenopausa e na pós-menopausa, não se observou alterações da



glicemia e insulinemia, apesar da grande variação do seu tipo e das dosagens de isoflavonas nestes estudos. Contudo, comparado o efeito da genisteína isolada com placebo houve decréscimo na glicemia de jejum (Ricci, Cipriani *et al.*, 2010).

A resistência insulínica pode decorrer de alterações no conteúdo e translocação dos transportadores de glicose GLUT4 (Thorens 1996; White 2003). Estudo realizado com ratas avaliou o efeito da ovariectomia sobre o conteúdo total de GLUT4 em tecidos muscular e adiposo, e mostrou não haver redução do transportador nesta circunstância. Os animais tratados com estrógeno, em doses fisiológicas e supra-fisiológicas, também não apresentaram alteração no transportador, mas a progesterona sim (Campbell and Febbraio 2002). Em mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos, ocorre um estado de resistência à insulina, que se acompanha de redução no conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo, independentemente da presença de obesidade (Rosenbaum, Haber *et al.* 1993).

Este estudo pretende analisar a influência fisiológica de fitoestrógenos sobre o metabolismo da glicose. Existe uma lacuna na literatura científica no que tange aos efeitos dos lignanos sobre a sensibilidade à insulina e dos fitoestrógenos, soja e linhaça, principalmente da sua relação sobre a expressão de transportadores de glicose (tecido adiposo, coração e músculo esquelético) *in vivo*, assim como é de interesse comparar estes efeitos aos do 17- $\beta$ -estradiol usado em doses fisiológicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos adotados durante os experimentos envolvendo os animais estão de acordo com Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e sob os padrões internacionais de pesquisa com animais – *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. A aprovação da pesquisa foi concedida previamente pela Comissão Científica e a Comissão de Ética do uso de animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 15/10/2009 (09-510).

### *Animais*

Foram utilizadas 44 ratas Wistar, com 90 dias de idade. Os animais foram provenientes do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos sob condições de biotério convencional na Unidade de Experimentação Animal no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores AIN 93G, água *ad libitum* e foram mantidos em caixas plásticas específicas com temperatura ambiental entre 20 e 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00/18:00h). As ratas foram divididas em 4 grupos experimentais e as intervenções dietéticas ocorreram durante 21 dias. Os grupos foram determinados de acordo com o tipo de intervenção dietética e reposição hormonal realizada (Tabela 1). Todas as ratas foram ovariectomizadas. A descrição detalhada dos componentes de cada ração com sua composição centesimal é apresentada no Anexo I.

**Tabela 1: Grupos Experimentais**

<b>Grupos*</b>	<b>N</b>	<b>Dieta**</b>	<b>Pellet</b>
C	12	AIN 93 G	Placebo
E	10	AIN 93 G	1,5mg 17β-Estradiol
L	12	Linhaça	Placebo
S	10	Soja	Placebo

C: controle, E: Estradiol, L: Linhaça, S: Soja. AIN 93G: Dieta padrão para roedores; Linhaça: dieta padrão com adição de proteína de linhaça; Soja: dieta padrão com adição proteína de soja. Pellets: 1,5mg por pellet (0,03 mg/dia; Innovative Research of America, Sarasota, Flórida, EUA).

### *Ovariectomia*

No dia zero do experimento, os animais foram anestesiados (80 mg/kg Ketamina e 10 mg/kg Xilazina, via intraperitoneal), e uma pequena incisão abdominal foi feita. Os ovários foram identificados, ligados e excisados. Pele e tecido muscular foram suturados.

### *Tratamentos*

As dietas e a inserção dos pellets foram iniciados 21 dias após a realização da ovariectomia. Os *pellets* foram inseridos com auxílio de um trocarte, sob anestesia (80 mg/kg Ketamina e 10 mg/kg Xilazina, 0.2 mL/100 g, via intraperitoneal).

### *Teste de tolerância à insulina*

Após 21 dias de tratamento, o teste de tolerância insulínica (kITT) foi realizado conforme descrito na literatura (Mori, Hirabara *et al.*, 2008). Sob jejum de 3 horas, os animais foram anestesiados com tiopental (40 mg/kg) com volumes de 500 a 700  $\mu$ L e colocados em decúbito dorsal para que a cauda fosse externada e exposta a veia caudal. Fez-se a ressecção da ponta da cauda e foi mensurada a glicemia no tempo zero antes da infusão de insulina, através de fitas reagentes (Advantage, Roche, Indianapolis, IN, USA). Pela veia da cauda foi injetada solução de insulina (0,1ml) diluída em 0,9 ml de uma solução de soro fisiológico 0,9%, calculada sobre o peso individual dos animais (0,75U/kg). Depois de injetada a insulina, a glicemia foi medida nos tempos 4, 8, 12, 16 e 20 minutos. Os valores obtidos de glicemia foram transformados em logaritmo neperiano. Foi realizada a regressão linear e a análise do coeficiente angular da equação da reta. Este, por sua vez, foi multiplicado por 100, conferindo o valor final em  $\% \cdot \text{min}^{-1}$ .

### *Canulação da artéria femoral*

Dois dias após o kITT, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina (80 mg/kg e 10 mg/kg, via IP) e um cateter de polietileno (PE-10) foi inserido no interior da artéria femoral. Primeiramente realizou-se uma incisão na parte posterior interna da coxa e a artéria femoral foi identificada. Uma incisão na artéria femoral foi realizada e a cânula foi posicionada no interior da aorta abdominal, e a pele foi suturada.

### *Registro da pressão arterial*

No dia seguinte à colocação das cânulas, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão, acoplado a um codificador de sinais, ligado por um seletor de canais à placa analógico-digital em computador. O programa utilizado (BIOPAC Systems, Califórnia/EUA) permite trabalhar diretamente com a onda de pulso, que é vista na tela do computador e os dados obtidos foram gravados. O programa calcula, para cada onda de pulso, valores de pico (sístole), vale (diástole) e período (entre um pico e outro), gerando uma planilha com estes valores, a qual é analisada no programa Microsoft Excel. Os registros foram realizados durante 30 minutos para avaliação de pressão arterial (PA) sistólica, diastólica e média, e frequência cardíaca (FC), com o animal consciente.

### *Retirada e preparação dos tecidos*

Após o registro da pressão arterial, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina (80 mg/kg e 10 mg/kg, via IP) e uma incisão abdominal foi realizada. Através de punção cardíaca, o sangue foi coletado, centrifugado e armazenado a -18°C. Os órgãos coração, tecido adiposo retroperitoneal, útero, gastrocnêmio, respectivamente, foram retirados de seus sítios anatômicos e apenas lavados com solução fisiológica, para então serem armazenados em freezer -

80°C na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do Centro de Pesquisas do HCPA. Todos os tecidos foram previamente pesados em balança analítica.

A preparação das amostras para análise do GLUT4 ocorreu conforme descrito por Machado e cols. (Machado, Shimizu *et al.*, 1993). Resumidamente, o tecido adiposo foi homogenizado utilizando-se Polytron (Marconi, Piracicaba, Brasil), através de 4 a 5 pulsos de 30 s à 20.000 rpm, em tampão (7,4 pH, 10mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA e 250mmol/l sacarose) na proporção 1:4 (peso:volume) e depois centrifugado a 2.000g, 4C, por 15 min. O sobrenadante, contendo o extrato livre de gordura (FFE), foi separado e centrifugado a 12.000g, 4C, por 15 min. O *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de tampão e corresponde à fração da membrana plasmática (PM). O sobrenadante, por sua vez, foi centrifugado a 150.000 g por 75 min, onde o sedimento obtido foi ressuspenso em 250 ul de tampão e corresponde a fração das vesículas microssomais (M).

O tecido cardíaco e o músculo esquelético foram homogenizados no mesmo tampão. O material obtido foi centrifugado a 1.000 g por 10 min. O sobrenadante foi separado, o sedimento ressuspenso com 1/3 do volume inicial e centrifugado novamente a 1.000 g por 10 min. O sobrenadante obtido neste passo foi misturado ao primeiro e levado à centrifugação durante 60 min a 16.000 g. O sedimento foi ressuspenso em 500 ul de tampão para obtenção da fração membrana plasmática (PM). O sobrenadante foi centrifugado a 150.000 g por 75 min, onde o sedimento obtido foi ressuspenso em 250 ul de tampão e corresponde a fração das vesículas microssomais (M).

#### *Western blot*

O GLUT4 foi avaliado por Western blot. Para determinação da concentração das proteínas foi utilizado o método de Bradford. As amostras (100 µg) foram submetidas à separação eletroforética (SDS-PAGE), os extratos protéicos foram aplicados em gel desnaturante 10% de

poliacrilamida/bis-acrilamida (Invitrogen, Carlsbad, EUA), juntamente com um marcador de peso molecular (BenchMark, Invitrogen, Burlington, EUA). Para a separação, foi utilizado tampão contendo 0,25M de Tris-base (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 1,92M de Glicina (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 1% de dodecil-sulfato de sódio (SDS, Invitrogen, Carlsbad, EUA). As proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Ge Healthcare, New York, EUA) e realizada incubação com tampão de bloqueio para reduzir ligações proteicas inespecíficas. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo específico (Millipore, Billerica), overnight a 4°C, o que foi seguido de uma incubação adicional de 3 horas a 37°C. Após, a membrana foi lavada (PBS/Tween 20 0,05%, 1 x 15 min, 3 x 5 min) e incubada durante 1 h com anticorpo secundário Goat anti-Rabbit IgG (Millipore, Billerica, EUA) para todas as proteínas analisadas. A membrana foi novamente lavada em PBS/Tween 20 (1 x 15 min, 4 x 5 min), incubada no escuro com substrato para peroxidase (kit ECL, GE Healthcare, New York, EUA) por 3 min e exposta a filme radiográfico ultra-sensível (Kodak, Frankfurt, Alemanha) durante 1h. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica, através do *software* de domínio público Scion Image e os resultados obtidos foram expressos como unidades arbitrárias (AU/ $\mu$ g proteína).

### *Perfil lipídico*

A análise do colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos foi feita por meio de kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os valores de absorbância (densidades ópticas) foram obtidos por espectrofotometria (Spectramax M2, Molecular Devices) e comparados a padrões, fornecidos pelos kits. Os resultados estão expressos em mg/dL.

### *Análise estatística*

Os resultados foram expressos em médias e desvios-padrão. As diferenças foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *post-hoc* de Tukey. Foi utilizado SPSS versão 17 (Windows) e GraphPad Prism versão 5 (Windows) para calcular a curva sobre área, quando necessário. O nível de significância utilizado para todos os testes foi de 5%.

## RESULTADOS

O peso corporal dos animais estudados está representado na Figura 1. As dietas determinaram uma variação no peso corporal ao longo das 7 semanas do experimento ( $p=0,040$ ). O grupo E apresentou menor peso corporal em relação grupo C ( $p=0,002$ ), bem como mostrou menor índice de Lee ( $p<0,001$ ), também comparados aos animais do grupo C (Tabela 1). Por outro lado, tanto o grupo L como o grupo S apresentaram valores semelhantes no índice Lee quando comparados ao grupo C e maiores que o grupo E ( $p<0,001$  e  $p=0,020$ , respectivamente). Em relação à sensibilidade insulínica, houve uma tendência de melhora no grupo S em relação aos demais grupos, embora sem significância estatística ( $p=0,066$ ). O peso do útero foi ~2.8 vezes maior ( $p<0,001$ ) nas ratas do grupo E em relação aos demais grupos, Tabela 1.

Os dados hemodinâmicos apresentados na Tabela 1 mostram que não houve variação na pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca, ao longo do estudo. Entretanto, houve uma leve redução da pressão arterial média das ratas do grupo S quando comparadas ao grupo L, mas sem significância estatística ( $p=0,065$ ).

O perfil lipídico está representado na Figura 2. As dietas com fitoestrógenos determinaram menores níveis de colesterol total ( $p=0,001$ ). O grupo L reduziu ~28% ( $p=0,037$ ) em relação ao grupo C, enquanto o grupo S mostrou uma diminuição de ~35% ( $p=0,011$ ), também comparado ao grupo C. Além disso, foi observada uma redução nos níveis de LDL ( $p=0,001$ ). O grupo com dieta a base de linhaça diminuiu ~40% ( $p=0,031$ ) enquanto os animais com dieta a base de soja tiveram uma maior redução ~56% ( $p=0,003$ ), ambos comparados ao grupo C, Figura 2B. Por outro lado, não houve diferença dos níveis de HDL entre animais estudados ( $p=0,052$ ), conforme observado na Figura 2C. Por fim, os níveis de triglicérides mostraram-se reduzidos ao final do experimento ( $p=0,007$ ). O grupo L obteve redução de ~60% ( $p=0,036$ ) enquanto os animais do grupo S



diminuíram ~71% ( $p=0,014$ ) quando comparados as ratas do grupo C, Figura 2D. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos E e C para as parâmetros lipídicos estudados.

No tecido adiposo branco (Figura 3), a expressão do GLUT4 na fração microssomal (Painel A) foi maior nos grupos com estradiol e linhaça quando comparados ao grupo controle ( $p=0,030$  e  $p=0,019$ ). Não houve diferença na expressão do GLUT4 do grupo S em relação aos demais. Entretanto, quando analisada a fração da membrana plasmática (Painel B), todas as intervenções (estradiol, linhaça ou soja) elevaram os níveis de GLUT4 em relação ao grupo controle (E: 102%,  $p<0,001$ ; L: 92%,  $p=0,011$ ; S: 81%,  $p=0,020$ ). A expressão do GLUT4 no coração está representada na Figura 4. O uso da linhaça aumentou a expressão do GLUT4 na fração microssomal do coração ~78% ( $p<0,001$ ) quando comparado ao grupo controle (Painel A), fato que não foi observado com o uso de estradiol ou da soja. Por sua vez, a análise do GLUT4 na fração da membrana plasmática (Painel B) mostrou que o estradiol, a linhaça e a soja aumentaram a quantidade do GLUT4 quando comparados ao grupo controle ( $p=0,026$ ;  $p=0,001$ ;  $p=0,040$  respectivamente). Por fim, a expressão do GLUT4 no músculo gastrocnêmio não se mostrou alterada nas frações analisadas em nenhum dos grupos de intervenção (estradiol, linhaça ou soja) quando comparados ao grupo controle (Figura 5).

**Tabela 2: Características dos animais estudados.**

	C (n=12)	E (n=10)	L (n=12)	S (n=10)
Índice de Lee	0,323 ± 0,009	0,304 ± 0,005*	0,318 ± 0,009†	0,315 ± 0,007†
kITT (%.min <sup>-1</sup> )	3,11 ± 0,63	3,93 ± 1,10	3,58 ± 0,69	4,21 ± 0,99
Peso do útero (g)	0,16 ± 0,05	0,65 ± 0,23*	0,17 ± 0,05†	0,16 ± 0,03†
PAS (mmHg)	122,3 ± 9,5	121,8 ± 7,2	126,9 ± 9,5	117,4 ± 9,7
PAD (mmHg)	88,1 ± 6,4	86,4 ± 7,7	91,0 ± 8,8	82,9 ± 7,9
PAM (mmHg)	104,9 ± 6,3	104,1 ± 6,6	108,9 ± 8,8	100,1 ± 8,1
Frequência cardíaca (bpm)	370,2 ± 45,7	351,1 ± 32,9	370,5 ± 29,1	365,7 ± 27,9

C: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet placebo (grupo controle), E: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet com estrógeno (grupo Estradiol), L: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de linhaça e pellet placebo (grupo Linhaça), S: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de soja e pellet placebo (grupo Soja). N: número de animais por grupo. kITT: constante de decaimento da glicose no teste de tolerância insulínica, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, PAM: pressão arterial média. Dados apresentados em média ± desvio-padrão. ANOVA uma via seguido de *post-hoc* de Tukey; \* p<0,05 vs. C, † p<0,05 vs. E.

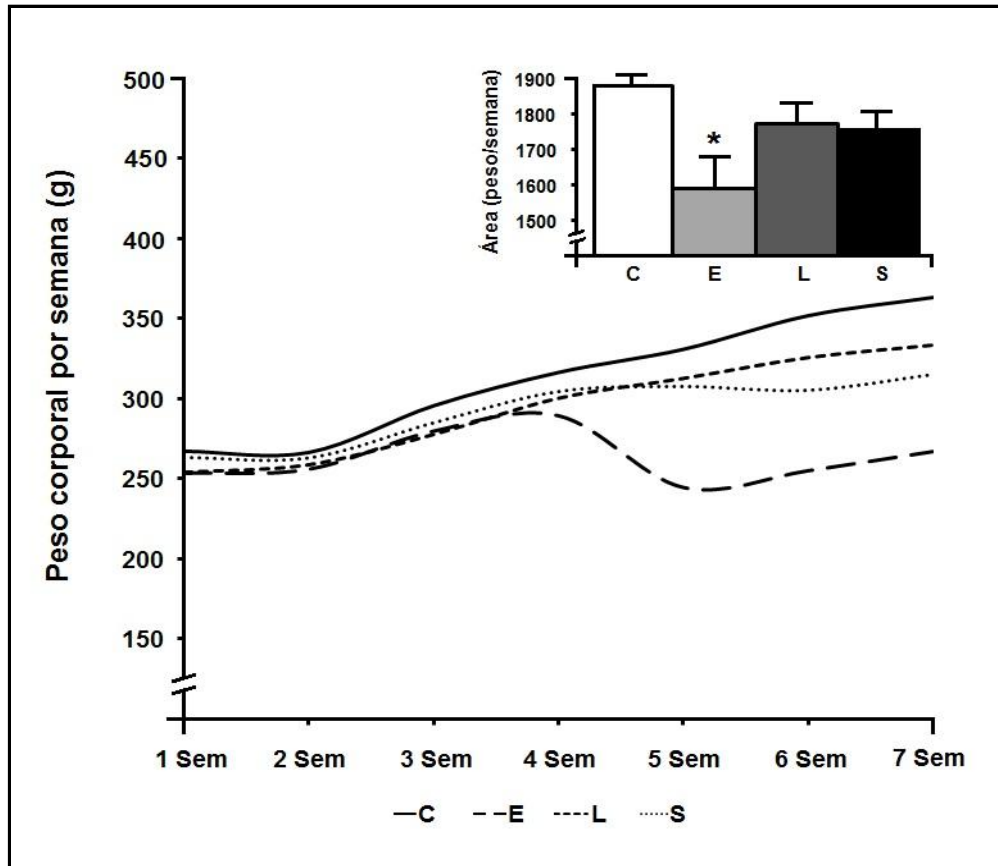


Figure 1 – Curva relativa ao peso corporal durante 7 semanas dos animais estudados. C: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet placebo (grupo controle), E: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet com estrógeno (grupo Estradiol), L: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de linhaça e pellet placebo (grupo Linhaça), S: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de soja e pellet placebo (grupo Soja). Valores representativos da área sobre a curva de pesos também são apresentados. ANOVA uma via seguido de *post-hoc* de Tukey; \*  $p < 0,05$  vs. C.

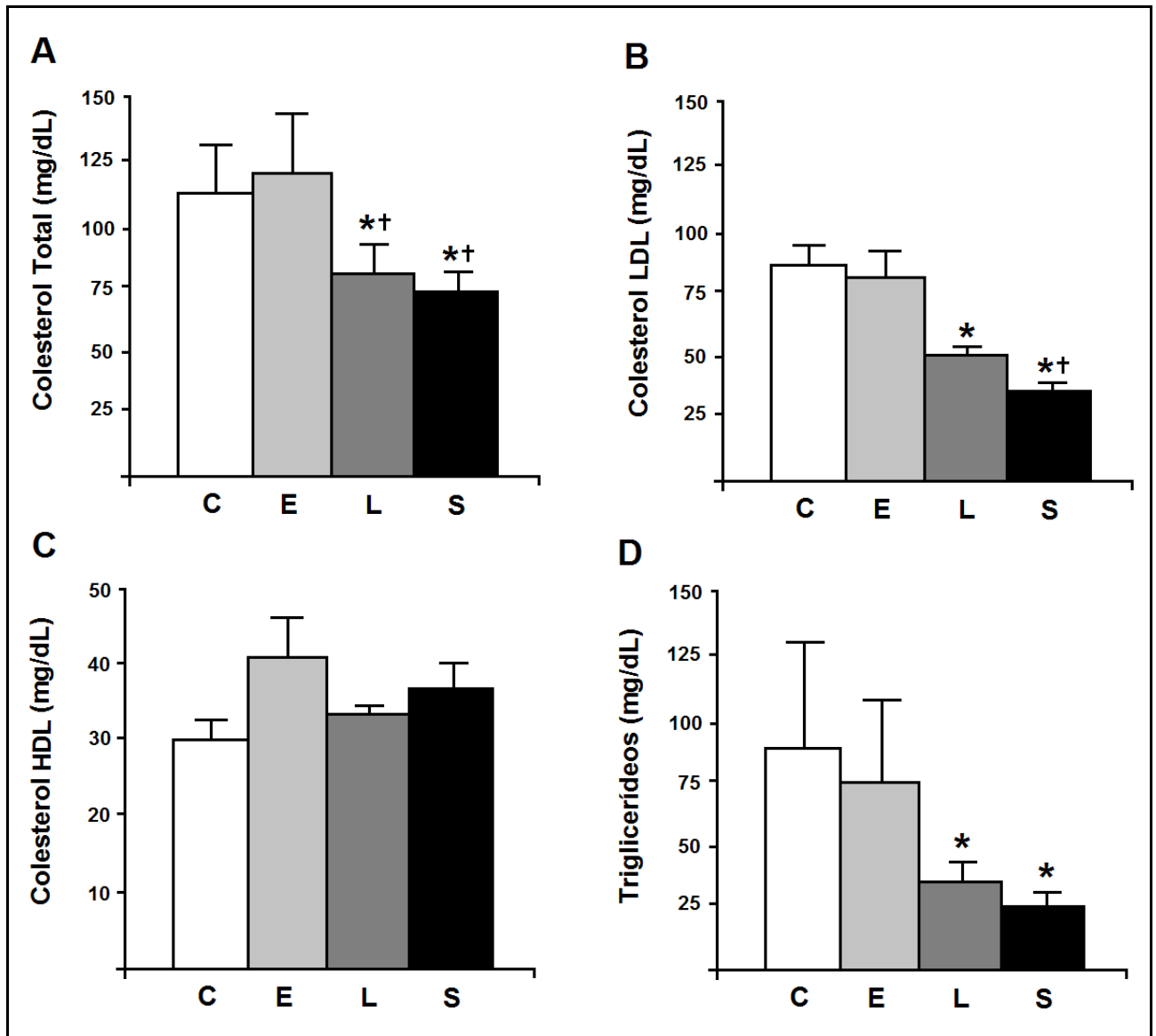


Figura 2 – Perfil lipídico dos animais estudados. C: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet placebo (grupo controle), E: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet com estrógeno (grupo Estradiol), L: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de linhaça e pellet placebo (grupo Linhaça), S: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de soja e pellet placebo (grupo Soja). Painel A: colesterol total. Painel B: lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Painel C: colesterol de alta densidade (HDL). Painel D: triglicerídeos. Dados são apresentados em média e desvio-padrão. ANOVA de uma via (Painel A:  $p=0,001$ ; Painel B:  $p=0,001$ ; Painel C:  $p=0,052$ ; Painel D:  $p=0,007$ ) seguido do *post-hoc* de Tukey; \*  $p<0,05$  vs. C e †  $p<0,05$  vs. E.

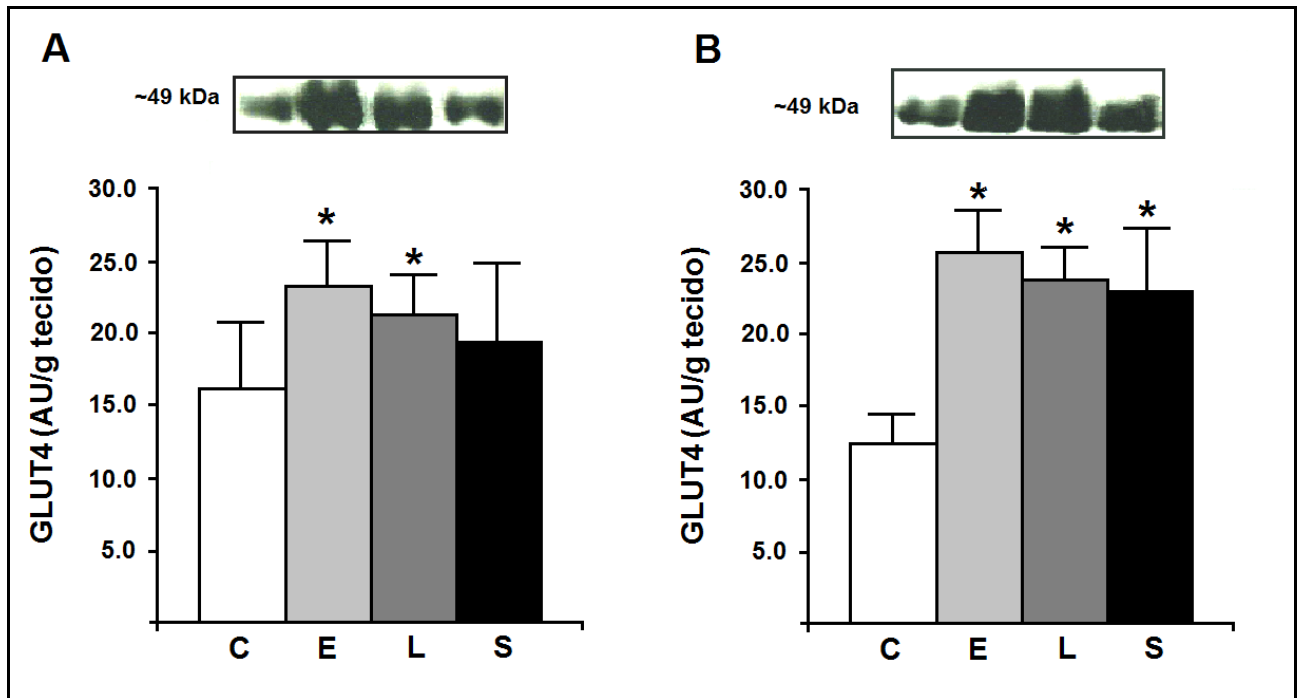


Figura 3 – Expressão do GLUT4 no tecido adiposo branco. Estão representadas as análises quantitativas e as respectivas bandas referentes ao Western blot. C: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet placebo (grupo controle), E: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet com estrógeno (grupo Estradiol), L: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de linhaça e pellet placebo (grupo Linhaça), S: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de soja e pellet placebo (grupo Soja). Painel A: representação da expressão do GLUT4 na fração microssomal. Painel B: representação da expressão do GLUT4 na membrana plasmática. UA: unidades arbitrárias. ANOVA de uma via (Painel A:  $p=0,040$ ; Painel B:  $p=0,016$ ) seguido do *post-hoc* de Tukey; \*  $p<0,05$  vs. C.

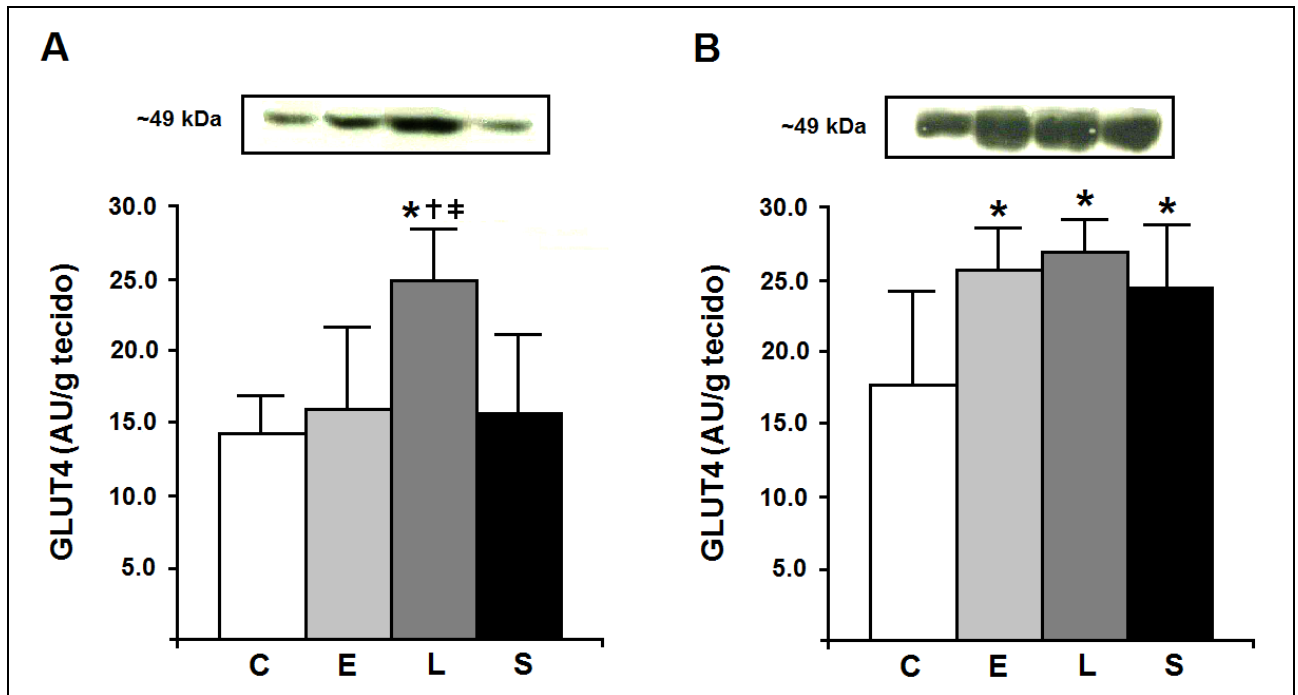


Figura 4 – Expressão do GLUT4 no **coração**. Estão representadas as análises quantitativas e as respectivas bandas referentes ao Western blot. C: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet placebo (grupo controle), E: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet com estrógeno (grupo Estradiol), L: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de linhaça e pellet placebo (grupo Linhaça), S: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de soja e pellet placebo (grupo Soja). Painel A: representação da expressão do GLUT4 na fração microssomal. Painel B: representação da expressão do GLUT4 na membrana plasmática. UA: unidades arbitrárias. ANOVA de uma via (Painel A:  $p=0,022$ ; Painel B:  $p=0,039$ ) seguido do *post-hoc* de Tukey; \*  $p<0,05$  vs. C; †  $p<0,05$  vs. E; ‡  $p<0,05$  vs. S.

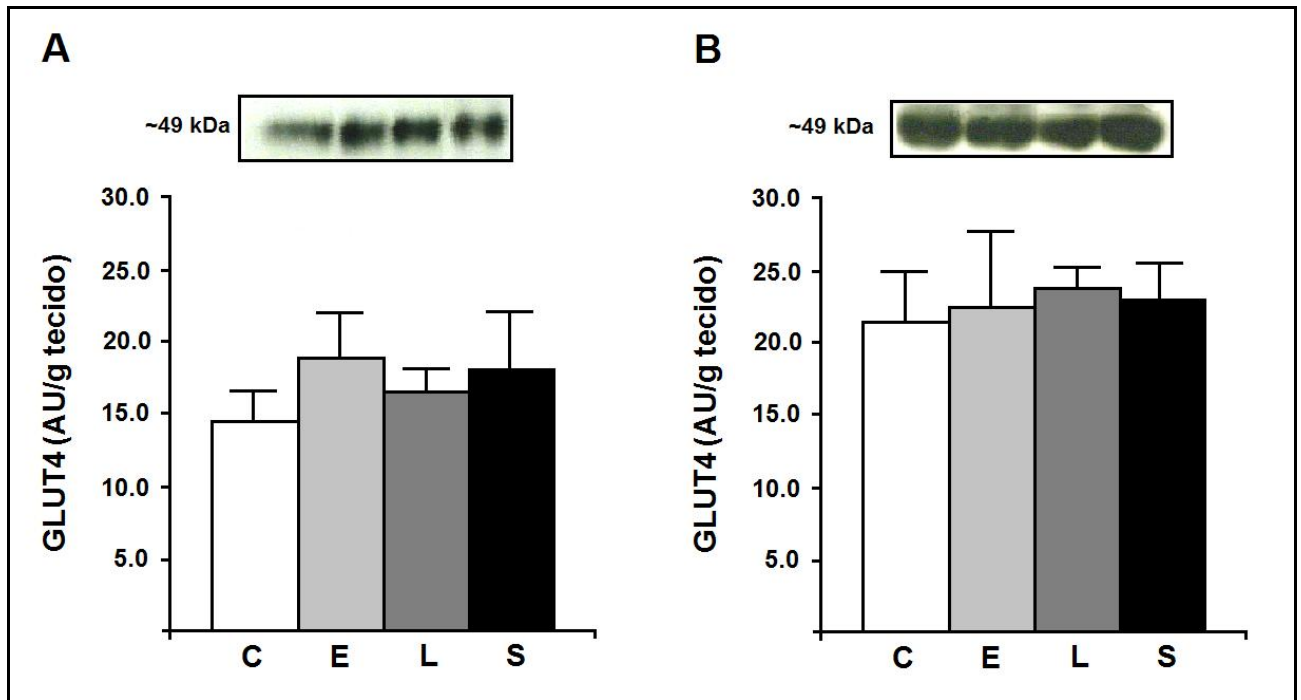


Figura 5 – Análise da expressão do GLUT4 no gastrocnêmio. Estão representadas as análises quantitativas e as respectivas bandas referentes ao Western blot. C: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet placebo (grupo controle), E: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e pellet com estrógeno (grupo Estradiol), L: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de linhaça e pellet placebo (grupo Linhaça), S: Ratas ovariectomizadas que receberam dieta com suplementação de soja e pellet placebo (grupo Soja). Painel A: representação da expressão do GLUT4 na fração microsomal. Painel B: representação da expressão do GLUT4 na membrana plasmática. UA: unidades arbitrárias. ANOVA de uma via (Painel A:  $p=0,109$ ; Painel B:  $p=0,726$ ).

## DISCUSSÃO

Este estudo mostrou, em modelo animal que mimetiza o estado de hipoestrogenismo pós-menopáusico, que o uso dos fitoestrógenos soja e linhaça é benéfico por acarretar redução de colesterol e triglicérides, mesmo sem alterar o peso corporal e a sensibilidade insulínica. Estes efeitos se acompanharam, em nível tecidual (tecido adiposo e coração), de aumento da expressão do transportador de glicose insulino-sensível GLUT4 em membrana plasmática principalmente, embora nenhum efeito tenha sido observado quando avaliado em músculo esquelético.

A fim de avaliar os efeitos metabólicos dos fitoestrógenos da linhaça e da soja e compará-los com os do estradiol em doses fisiológicas, nós utilizamos um modelo experimental de menopausa, a ovariectomia. Este modelo foi utilizado previamente (Kalu 1991, Rubin BS 1985) e satisfatoriamente reproduzido em nosso laboratório. Embora não tenhamos apresentado dados relacionados aos níveis estrogênicos plasmáticos, a redução do peso uterino no grupo controle (ovariectomizadas e sem reposição estrogênica) e seu aumento com o uso de doses fisiológicas de estrógeno (ovariectomizadas e com reposição estrogênica) indicam o sucesso do procedimento e reposição hormonal idealizados. Sabe-se que os hormônios ovarianos são responsáveis pelo crescimento e manutenção dos tecidos e órgãos femininos, portanto a interrupção no fornecimento destes hormônios levaria à perda de função e consequente atrofia destes órgãos. Como em outros estudos, as ratas ovariectomizadas apresentaram atrofia uterina com importante redução do peso uterino, o que foi revertido com o uso de estradiol (Gallo D, 2005; Torrezan R, 2008). Observamos também que os fitoestrógenos utilizados não foram capazes de afetar o peso uterino, como mostrado previamente na literatura com o uso de soja no mesmo modelo (Yoneda 2011, Gallo 2008) e de genisteína em humanos (D'Anna 2009). Esta informação é importante considerando-se a segurança de seu uso, em se confirmando estes resultados em longo prazo.



Nossos resultados mostraram que a privação dos hormônios ovarianos foi responsável pelo maior ganho de peso e índice de Lee nas ratas que não receberam nenhuma intervenção, corroborando com outros estudos que avaliaram o efeito da ovariectomia e reposição hormonal no peso corporal (Jimenez Ma, 1997; Sibonga Jd, 2003; Saruhan Bg, 2005; Henriques Hn, 2010). O estrogênio poderia estar relacionado com maior gasto energético (Guyard B, 1991), o que justificaria o menor ganho de peso no grupo que foi tratado com este hormônio. O fato das ratas tratadas com fitoestrógenos terem apresentado ganho de peso semelhante ao grupo sem nenhum tratamento sugere que este tratamento não interferiu na ingestão alimentar e gasto energético das mesmas, embora estas variáveis não tenham sido medidas. Resultados semelhantes foram observados na literatura para genisteína e daidzeína injetáveis em ratas ovariectomizadas (Banz 2004) e em mulheres pós-menopausa tratadas com soja (Charles 2009). Já em mulheres pós-menopausa tratadas com linhaça na dieta houve redução de peso corporal (Morisset 2009). No entanto, estes resultados são oriundos de estudos observacionais, onde há possibilidade de que o elevado consumo de linhaça se associe com melhores hábitos de vida, e portanto, dieta mais saudável e menor peso corporal.

Os hormônios femininos atuam tanto na lipogênese, reduzindo a atividade da lipase lipoproteica, enzima responsável pelo armazenamento de lipídeos nos adipócitos, como na lipólise, aumentando a atividade da enzima lipase hormônio sensível, que é responsável pela mobilização das gorduras dos adipócitos (Cooke Ps, 2004). No entanto, em nosso estudo os animais que receberam  $17\beta$ -estradiol não apresentaram alterações do perfil lipídico. Já os níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides dos grupos tratados com soja e linhaça apresentaram-se reduzidos após o tratamento, o que difere do observado em humanos, em que a linhaça na dieta não foi capaz de reduzir os níveis de lipídios (Simbalista RL 2010, Hallund 2006). É possível que esta diferença seja oriunda de diferenças na quantidade de fitoestrógenos empregada, considerando-se a proporção em relação ao peso dos indivíduos e em relação aos

demais macronutrientes da dieta. Portanto, o potencial benefício da soja e da linhaça no tratamento das dislipidemias, muito frequentes em mulheres na menopausa, deve ser considerado.

A ovariectomia não se associou com alterações pressóricas, em acordo com relatos em ratas normotensas jovens (Clark JT 2004). Sabe-se que o aumento de pressão arterial que pode ocorrer em mulheres após a menopausa poderia se relacionar com a deficiência de estrógenos, mas outros fatores também estão envolvidos (Boldo 2011). Em ratas ovariectomizadas, o tempo de privação de estrógeno foi determinante na indução de aumentos de pressão arterial, que ocorreram apenas tardiamente após o procedimento em outro estudo (Clarck 2004). O uso de estrógeno não determinou aumento pressórico, talvez por ter sido administrado por via subcutânea e não oral (Carvalho 2008, Spritzer 2003) ou pelo baixo risco desta complicação, já que as ratas eram jovens e normotensas.

Dentre os mecanismos que poderiam determinar redução de pressão arterial nas ratas ovariectomizadas tratadas com fitoestrógenos, podem ser citados: redução de contratilidade da aorta previamente mostrada *in vitro* (Li HF 2004), menor rigidez arterial (Teede HJ 2003), aumento na expressão de eNOS e melhora da função endotelial (Mahn K 2005) previamente mostrados *in vivo*. No entanto, nenhum efeito sobre a pressão arterial pode ser observado com o uso das dietas ricas em soja e linhaça administradas, talvez porque as ratas eram normotensas, jovens, ou mesmo, que as doses administradas sejam diferentes de outras que previamente se associaram a efeitos pressóricos em ratos (Mahn 2005). Corroboram nossos resultados os de revisão sistemática realizada em humanos, que não encontrou associação entre o uso de fitoestrógenos e redução da pressão arterial (Rosero Arenas 2008).

Flutuações hormonais acima ou abaixo dos níveis fisiológicos, como da gestação (Rushakoff, R. e Kalkhoff, R., 1981; Barros, R. P. D. A., Morani, A. *et al.*, 2008) e menopausa (Cagnacci, Soldani *et al.*, 1992a) podem resultar em resistência à insulina e aumentar o risco de diabetes e doenças cardiovasculares. Nosso estudo não foi capaz de mostrar diferença na

sensibilidade insulínica entre os grupos estudados, mas a dieta rica em soja apresentou uma tendência a aumento da sensibilidade insulínica em relação ao grupo controle ( $p=0,064$ ). Tendo em vista os resultados benéficos do uso de fitoestrógenos sobre a sensibilidade à insulina e metabolismo glicêmico relatados em mulheres (Ricci 2010, Villa 2009), pode-se especular que aumento do tempo de administração ou da quantidade de soja administrada, ou mesmo aumento do tamanho da amostra poderiam mostrar benefícios metabólicos nesses animais.

A resistência insulínica pode ocorrer devido a alterações nas vias de sinalização que levam à translocação do GLUT4 para a membrana plasmática de células insulino-sensíveis e/ou no recrutamento de vesículas que contem estas proteínas (Zhou, Chen *et al.*, 1999b). O GLUT4 é expresso no músculo cardíaco, esquelético e tecido adiposo (Machado, 1998). Em nosso estudo pudemos observar que o estradiol aumentou a expressão de GLUT4 em membrana plasmática e microsomal, tanto em tecido adiposo como no tecido no cardíaco. O estradiol possui relação com a homeostase glicêmica, mas como ele atua sobre o GLUT4 não está bem estabelecido. O ER $\alpha$ , são encontrados em maior proporção no músculo, e tem o papel de estimular a expressão de GLUT4. Já os ER $\beta$ , encontrados em maior quantidade no tecido adiposo, inibem esta expressão (Barros Rpa, 2009). Portanto, em nosso estudo a hipótese seria de que o estradiol estaria aumentando a captação de glicose em músculo cardíaco e também em tecido adiposo.

A soja aumentou a expressão de GLUT4 no tecido adiposo e no tecido cardíaco, mas apenas na fração da membrana plasmática. Estudo com o metabólito da dadzeína, o equol, sobre células 3T3-L1, mostrou aumento da expressão de GLUT4 e de IRS-1 através da ativação do fator transcricional PPAR $\gamma$  (Receptores Ativados de Proliferador de Peroxissomo Gama), responsável pelo armazenamento de ácidos graxos e metabolismo da glicose (Cho Kw, 2010). A linhaça também aumentou expressão do GLUT4, nos tecidos adiposo e cardíaco, mostrando possível efeito estrogênico. Interessante observar que o uso de genisteína injetável por 2 semanas não foi capaz de alterar a expressão de GLUT4 em ratas ovariectomizadas em outros estudos (Al-Nakkash

2010). Como vários estudos mostraram aumento de sensibilidade insulínica com o uso de fitoestrógenos de uso oral (Ricci 2010, Villa 2009), nossos resultados devem estar refletindo o que realmente ocorre na prática, pois isso poderia se dar por aumento de GLUT4 em tecidos insulino-sensíveis.

Concluimos que o uso de soja e linhaça como parte da dieta de modelo animal de menopausa traz benefícios de potencial aplicabilidade clínica, tanto em melhora de perfil lipídico como de aumento de GLUT4 em tecidos insulino-sensíveis, sem determinar prejuízos tanto por efeitos estrogênio-similares no aparelho reprodutor, como no sistema cardiovascular.

## **SUPORTE FINANCEIRO**

Este projeto foi financiado pela Fapergs (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) - Procoredes IV, FIPE (Fundo de incentivo ao pesquisador do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## REFERÊNCIAS ARTIGO

- Al-Nakkash, L., B. Markus, *et al.* Genistein Induces Estrogen-Like Effects in Ovariectomized Rats but Fails to Increase Cardiac GLUT4 and Oxidative Stress. Journal of Medicinal Food, v.13, n.6, p.1369-1375. 2010.
- Anhe, G. F., S. M. Hirabara, *et al.* Postpartum glycemc homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.292, n.6, Jun, p.R2225-33. 2007.
- Anvisa. Portaria N° 398, de 30 de abril de 1999. 1999.
- Aso, T., S. Uchiyama, *et al.* A Natural S(-) Equol Supplement Alleviates Hot Flushes and Other Menopausal Symptoms in Equol Nonproducing Postmenopausal Japanese Women. Journal of Women's Health, v.20. 2011.
- Banerjee, S. K., K. R. Mcgaffin, *et al.* SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. Cardiovasc Res, v.84, n.1, Oct 1, p.111-8. 2009.
- Barros, R. P., U. F. Machado, *et al.* Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. Trends Mol Med, v.12, n.9, Sep, p.425-31. 2006.
- \_\_\_\_\_. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.5, Jan 31, p.1605-8. 2006.
- Barros, R. P., Machado, U.F. Efeitos do 17-beta-estradiol na expressão do mRNA do GLUT4 em células musculares da linhagem L6. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v.48, n.Supl 1, p.S141-S141. 2004.
- Barros, R. P., A. Morani, *et al.* Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. Mol Cell Endocrinol, v.295, n.1-2, Nov 25, p.24-31. 2008.
- Barros Rpa, G. C., Morani a, Warner M, Gustafsson .Ã. Participation of ER<sup>±</sup> and ER<sup>2</sup> in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, v.297, n.1, p.E124-E133. 2009.
- Barros, R. P. D. A., A. Morani, *et al.* Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. Molecular and cellular endocrinology, v.295, n.1-2, p.24-31. 2008.
- Bazuine, M., P. J. Van Den Broek, *et al.* Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun, v.326, n.2, Jan 14, p.511-4. 2005.
- Bhathena, S. J. e M. T. Velasquez. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. Am J Clin Nutr, v.76, n.6, Dec, p.1191-201. 2002.
- Boden, G. e G. Shulman. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and Î²-cell dysfunction. European Journal of Clinical Investigation, v.32, p.14-23. 2002.

Bruun, J. M., C. B. Nielsen, *et al.* Estrogen reduces pro-inflammatory cytokines in rodent adipose tissue: studies in vivo and in vitro. Horm Metab Res, v.35, n.3, Mar, p.142-6. 2003.

Cagnacci, A., R. Soldani, *et al.* Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.74, n.6, p.1396. 1992a.

\_\_\_\_\_. Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, v.74, n.6, Jun, p.1396-400. 1992b.

Campbell, S. E. e M. A. Febbraio. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.282, n.5, May, p.E1139-46. 2002.

Cho Kw, L. O., Banz Wj, Moustaid-Moussa N, Shay Nf, Kim Yc. Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPAR $\gamma$  transcriptional activity. The Journal of Nutritional Biochemistry, v.21, n.9, p.841-847. 2010.

Clapauch, R., R. M. Meirelles, *et al.* Phytoestrogens: Position of the Department of Female Endocrinology of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v.46, n.6, p.679-695. 2002.

Cooke Ps, N. A. Role of estrogens in adipocyte development and function. Experimental Biology and Medicine, v.229, n.11, p.1127-1135. 2004.

Cousins, L. Insulin sensitivity in pregnancy. Diabetes, v.40 Suppl 2, Dec, p.39-43. 1991.

Crisafulli, A., D. Altavilla, *et al.* Effects of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. Menopause, v.12, n.2, Mar, p.186-92. 2005.

D'anna, R., M. L. Cannata, *et al.* Effects of the phytoestrogen genistein on hot flushes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. Menopause, v.16, n.2, p.301. 2009.

Di Virgilio, A. L., K. Iwami, *et al.* Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. Toxicol Lett, v.151, n.1, Jun 15, p.151-62. 2004.

Escalante Pulido, J. M. e M. Alpizar Salazar. Changes in insulin sensitivity, secretion and glucose effectiveness during menstrual cycle. Arch Med Res, v.30, n.1, Jan-Feb, p.19-22. 1999.

Eschwege, E. The dysmetabolic syndrome, insulin resistance and increased cardiovascular (CV) morbidity and mortality in type 2 diabetes: aetiological factors in the development of CV complications. Diabetes & metabolism, v.29, n.4, p.6S19-6S27. 2003.

Evans, M., J. G. Elliott, *et al.* The effect of synthetic genistein on menopause symptom management in healthy postmenopausal women: a multi-center, randomized, placebo-controlled study. Maturitas, v.68, n.2, Feb, p.189-96. 2011.

- Ezenwaka, E. C., A. O. Akanji, *et al.* Insulin responses following glucose administration in menstruating women. Int J Gynaecol Obstet, v.42, n.2, Aug, p.155-9. 1993.
- Fao. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Reports on Functional foods 2007.
- Florian, M., Y. Lu, *et al.* Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. Steroids, v.69, n.10, Sep, p.637-45. 2004.
- Folli, F., M. J. Saad, *et al.* Crosstalk between insulin and angiotensin II signalling systems. Exp Clin Endocrinol Diabetes, v.107, n.2, p.133-9. 1999.
- Galien, R. e T. Garcia. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. Nucleic Acids Res, v.25, n.12, Jun 15, p.2424-9. 1997.
- Gallo D, Z. G., Apollonio P, Martinelli E, Ferlini C, Pasetti G, Riva a, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G. Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. Menopause, v.12, n.5, p.589. 2005.
- Garvey, W. T., L. Maianu, *et al.* Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes. Heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters. Diabetes, v.42, n.12, Dec, p.1773-85. 1993.
- Gonzalez, C., A. Alonso, *et al.* Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on insulin receptor substrate-1. Jop, v.2, n.4, Jul, p.140-9. 2001.
- Gould, G. W. e G. D. Holman. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. Biochem J, v.295 ( Pt 2), Oct 15, p.329-41. 1993.
- Guan, L., S. Y. Yeung, *et al.* Both soybean and kudzu phytoestrogens modify favorably the blood lipoprotein profile in ovariectomized and castrated hamsters. J Agric Food Chem, v.54, n.13, Jun 28, p.4907-12. 2006.
- Guyard B, F. J., Brigant L, Betoulle D, Apfelbaum M. Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. Metabolism, v.40, n.5, p.529-533. 1991.
- Hall, J. M. e D. P. McDonnell. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. Endocrinology, v.140, n.12, Dec, p.5566-78. 1999.
- Hall, W. L., K. Vafeiadou, *et al.* Soy-isoflavone-enriched foods and markers of lipid and glucose metabolism in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. Am J Clin Nutr, v.83, n.3, Mar, p.592-600. 2006.
- Hasler, C. e A. Brown. Position of the American Dietetic Association: functional foods. Journal of the American Dietetic Association, v.109, n.4, p.735. 2009.



- Henriques Hn, C. N., De Carvalho Ac, Pantaleão Ja, Guzmán-Silva Ma. Efeito de doses elevadas de tibolona sobre o peso corporal e perfil lipídico de ratas ooforectomizadas. Rev Bras Ginecol Obstet, v.32, n.2, p.88-93. 2010.
- Herrington, D. M., D. M. Reboussin, *et al.* Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. N Engl J Med, v.343, n.8, Aug 24, p.522-9. 2000.
- Hulley, S., D. Grady, *et al.* Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. JAMA, v.280, n.7, Aug 19, p.605-13. 1998.
- Huppertz, C., B. M. Fischer, *et al.* Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. J Biol Chem, v.276, n.16, Apr 20, p.12520-9. 2001.
- Hwang, C. S., H. S. Kwak, *et al.* Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. J Steroid Biochem Mol Biol, v.101, n.4-5, Nov, p.246-53. 2006.
- Isomaa, B., P. Almgren, *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. Diabetes care, v.24, n.4, p.683. 2001.
- Jackman, K. A., O. L. Woodman, *et al.* Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights. Curr Med Chem, v.14, n.26, p.2824-30. 2007.
- Jeng, M. H., M. A. Shupnik, *et al.* Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. Endocrinology, v.139, n.10, Oct, p.4164-74. 1998.
- Jeppesen, J., T. W. Hansen, *et al.* C-reactive protein, insulin resistance and risk of cardiovascular disease: a population-based study. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, v.15, n.5, p.594. 2008.
- \_\_\_\_\_. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease: a population-based study. Journal of the American College of Cardiology, v.49, n.21, p.2112-2119. 2007.
- Jimenez Ma, M. D., Bryant Hu, Turner Rt. Clomiphene prevents cancellous bone loss from tibia of ovariectomized rats. Endocrinology, v.138, n.5, p.1794-1800. 1997.
- Jones, K. L., J. Harty, *et al.* In vitro effects of soy phytoestrogens on rat L6 skeletal muscle cells. J Med Food, v.8, n.3, Fall, p.327-31. 2005.
- Klein, C. B. e A. A. King. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. Toxicol Appl Pharmacol, v.224, n.1, Oct 1, p.1-11. 2007.
- Kreijkamp-Kaspers, S., L. Kok, *et al.* Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. JAMA, v.292, n.1, Jul 7, p.65-74. 2004.

- Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology, v.139, n.10, Oct, p.4252-63. 1998.
- Kumagai, S., A. Holmang, *et al.* The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats. Acta Physiol Scand, v.149, n.1, Sep, p.91-7. 1993.
- Lavigne, C., A. Marette, *et al.* Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.278, n.3, Mar, p.E491-500. 2000.
- Lee, M. S., C. H. Kim, *et al.* Genistein-derivatives from *Tetracera scandens* stimulate glucose-uptake in L6 myotubes. Biol Pharm Bull, v.32, n.3, Mar, p.504-8. 2009.
- Linassier, C., M. Pierre, *et al.* Mechanisms of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity. Biochem Pharmacol, v.39, n.1, Jan 1, p.187-93. 1990.
- Liu, M. L., X. Xu, *et al.* Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. Int J Cardiol, v.97, n.3, Dec, p.485-93. 2004.
- Livingstone, C. e M. Collison. Sex steroids and insulin resistance. Clin Sci (Lond), v.102, n.2, Feb, p.151-66. 2002.
- Machado, U. Transportadores de Glicose. Arq Bras Endocrinol Metab v.42, n.6, p.413-421. 1998.
- Machado, U., Y. Shimizu, *et al.* Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamatetreated mice. Horm Metab Res, v.25, n.462-5. 1993.
- Manach, C., A. Scalbert, *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition, v.79, n.5, p.727. 2004.
- Martin, P. M., K. B. Horwitz, *et al.* Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. Endocrinology, v.103, n.5, Nov, p.1860-7. 1978.
- Mcfarlane, S. I., M. Banerji, *et al.* Insulin resistance and cardiovascular disease. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.86, n.2, p.713. 2001.
- Minami, K., R. Moriyama, *et al.* Identification of soybean protein components that modulate the action of insulin in vitro. Agric Biol Chem, v.54, n.2, Feb, p.511-7. 1990.
- Mori, R. C., S. M. Hirabara, *et al.* Glimperide as insulin sensitizer: increased liver and muscle responses to insulin. Diabetes Obes Metab, v.10, n.7, Jul, p.596-600. 2008.
- Moutsatsou, P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. Hormones (Athens), v.6, n.3, Jul-Sep, p.173-93. 2007.
- Nomura, M., T. Takahashi, *et al.* Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. Biol Pharm Bull, v.31, n.7, Jul, p.1403-9. 2008.

- Okuno, S., S. Akazawa, *et al.* Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy. Horm Metab Res, v.27, n.5, May, p.231-4. 1995.
- Pan, L., X. Xia, *et al.* Exposure to the phytoestrogen daidzein attenuates apomorphine-induced penile erection concomitant with plasma testosterone level reduction in dose- and time-related manner in adult rats. Urology, v.70, n.3, Sep, p.613-7. 2007.
- Pencina, M. J., R. B. D'agostino, *et al.* Predicting the 30-Year Risk of Cardiovascular Disease. Circulation, v.119, n.24, p.3078-3084. 2009.
- Peng, N., J. T. Clark, *et al.* Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.289, n.3, Sep, p.R771-5. 2005.
- Rea, S. e D. E. James. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. Diabetes, v.46, n.11, Nov, p.1667-77. 1997.
- Reece, E. A., C. Homko, *et al.* Metabolic changes in diabetic and nondiabetic subjects during pregnancy. Obstet Gynecol Surv, v.49, n.1, Jan, p.64-71. 1994.
- Ricci, E., S. Cipriani, *et al.* Effects of soy isoflavones and genistein on glucose metabolism in perimenopausal and postmenopausal non-Asian women: a meta-analysis of randomized controlled trials. Menopause, v.17, n.5, Sep-Oct, p.1080-6. 2010.
- Rosenbaum, D., R. S. Haber, *et al.* Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. Am J Physiol, v.264, n.2 Pt 1, Feb, p.E197-202. 1993.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA, v.288, n.3, Jul 17, p.321-33. 2002.
- Rushakoff, R. e R. Kalkhoff. Effects of pregnancy and sex steroid administration on skeletal muscle metabolism in the rat. Diabetes, v.30, n.7, p.545. 1981.
- Rushakoff, R. J. e R. K. Kalkhoff. Effects of pregnancy and sex steroid administration on skeletal muscle metabolism in the rat. Diabetes, v.30, n.7, Jul, p.545-50. 1981.
- Rutter, M. K., J. B. Meigs, *et al.* Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. Diabetes, v.54, n.11, p.3252. 2005.
- Ryder, J. W., M. Gilbert, *et al.* Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations. Front Biosci, v.6, Feb 1, p.D154-63. 2001.
- Saengsirisuwan, V., S. Pongseeda, *et al.* Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. Metabolism, v.58, n.1, Jan, p.38-47. 2009.

- Santen, R. J., R. X. Song, *et al.* Long-term estradiol deprivation in breast cancer cells up-regulates growth factor signaling and enhances estrogen sensitivity. Endocr Relat Cancer, v.12 Suppl 1, Jul, p.S61-73. 2005.
- Saruhan Bg, O. N. Effect of ovariectomy and of estrogen treatment on the adrenal gland and body weight in rats. Saudi medical journal, v.26, n.11, p.1705-1709. 2005.
- Scalbert, A. e G. Williamson. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr, v.130, n.8S Suppl, Aug, p.2073S-85S. 2000.
- Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. Journal of Clinical Investigation, v.106, n.2, p.171-176. 2000.
- Sibonga Jd, L. S., Evans Gl, Pribluda Vs, Green Sj, Turner Rt. Dose-response effects of 2-methoxyestradiol on estrogen target tissues in the ovariectomized rat. Endocrinology, v.144, n.3, p.785-792. 2003.
- Sosic-Jurjevic, B., B. Filipovic, *et al.* Subcutaneously administrated genistein and daidzein decrease serum cholesterol and increase triglyceride levels in male middle-aged rats. Exp Biol Med (Maywood), v.232, n.9, Oct, p.1222-7. 2007.
- Sowers, M. e M. T. La Pietra. Menopause: its epidemiology and potential association with chronic diseases. Epidemiologic reviews, v.17, n.2, p.287. 1995.
- Stirone, C., A. Boroujerdi, *et al.* Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. Mol Pharmacol, v.67, n.1, Jan, p.105-13. 2005.
- Sugano, M., N. Ishiwaki, *et al.* Effects of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats. Br J Nutr, v.48, n.2, Sep, p.211-21. 1982.
- Taha, S. A. e M. M. Wasif. Hypoglycemic effect and protein nutritive quality of soy and methionine-supplemented whole durum pasta products. Nahrung, v.40, n.5, Oct, p.281-7. 1996.
- Tang, Y. B., Q. L. Wang, *et al.* Phytoestrogen genistein supplementation increases eNOS and decreases caveolin-1 expression in ovariectomized rat hearts. Sheng Li Xue Bao, v.57, n.3, Jun 25, p.373-8. 2005.
- Taylor, R. e J. M. Davison. Type 1 diabetes and pregnancy. Bmj, v.334, n.7596, Apr 7, p.742-5. 2007.
- Tempfer, C. B., E. K. Bentz, *et al.* Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. Fertil Steril, v.87, n.6, Jun, p.1243-9. 2007.
- Thompson, L. U., B. A. Boucher, *et al.* Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. Nutr Cancer, v.54, n.2, p.184-201. 2006.

Thorens, B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, v.270, n.4, p.G541-G553. 1996a.

\_\_\_\_\_. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. Am J Physiol, v.270, n.4 Pt 1, Apr, p.G541-53. 1996b.

Tonetti, D. A., Y. Zhang, *et al.* The effect of the phytoestrogens genistein, daidzein, and equol on the growth of tamoxifen-resistant T47D/PKC alpha. Nutr Cancer, v.58, n.2, p.222-9. 2007.

Torrezan R, G. R., Ferrarese MI, Melo Fbh, Ramos a, Mathias Pcf, Scomparin Dx. O tratamento com isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. Arq. bras. endocrinol. metab, v.52, n.9, p.1489-1496. 2008.

Tousen, Y., J. Ezaki, *et al.* Natural S-equol decreases bone resorption in postmenopausal, non-equol-producing Japanese women: a pilot randomized, placebo-controlled trial. Menopause, v.18, n.5, p.563. 2011.

Tsai, A. C., E. L. Mott, *et al.* Effects of soy polysaccharide on gastrointestinal functions, nutrient balance, steroid excretions, glucose tolerance, serum lipids, and other parameters in humans. Am J Clin Nutr, v.38, n.4, Oct, p.504-11. 1983.

Tsai, A. C., A. I. Vinik, *et al.* Effects of soy polysaccharide on postprandial plasma glucose, insulin, glucagon, pancreatic polypeptide, somatostatin, and triglyceride in obese diabetic patients. Am J Clin Nutr, v.45, n.3, Mar, p.596-601. 1987.

Turner, R., H. Millns, *et al.* Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). Bmj, v.316, n.7134, p.823-828. 1998.

Usda. US Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans. 2010.

Valsecchi, A. E., S. Franchi, *et al.* The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. European journal of pharmacology, v.650, n.2, p.694-702. 2010.

Varayoud, J., J. G. Ramos, *et al.* The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus. J Endocrinol, v.186, n.1, Jul, p.51-60. 2005.

Vasconcellos, A. B., E. Recine, *et al.* Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde Brasília. 2006. 217 p.

Vedavanam, K., S. Sriyayanta, *et al.* Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). Phytother Res, v.13, n.7, Nov, p.601-8. 1999.

White, M. F. Insulin signaling in health and disease. Science, v.302, n.5651, p.1710. 2003.

Who. Research on the Menopause. WHO Library Cataloguing in Publication Date. 1990.

Zechhin, H., J. B. C. Carvalheira, *et al.* Mecanismos moleculares da resistência a insulina na síndrome metabólica. Rev Soc Cardiol Est de São Paulo, v.14, p.574-89. 2004.

Zhang, X., S. W. Li, *et al.* Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis. Gynecological Endocrinology, v.26, n.2, p.76-80. 2010.

Zhou, L., H. Chen, *et al.* Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. Mol Endocrinol, v.13, n.3, Mar, p.505-14. 1999a.

\_\_\_\_\_. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. Molecular Endocrinology, v.13, n.3, p.505-514. 1999b.

Zorzano, A., T. Santalucia, *et al.* Searching for ways to upregulate GLUT4 glucose transporter expression in muscle. Gen Pharmacol, v.31, n.5, Nov, p.705-13. 1998.

Zorzano, A., L. Sevilla, *et al.* Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. Am J Cardiol, v.80, n.3A, Aug 4, p.65A-76A. 1997.

**ANEXO 1: Dietas experimentais utilizadas.**

<i>AIN 93 G</i>			<i>Farinha Linhaça</i>			<i>Semente de Soja</i>		
<b>Ingredientes</b>	<b>p/ 1 Kg</b>	<b>Un</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>p/ 1 Kg</b>	<b>Un</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>p/ 1 Kg</b>	<b>Un</b>
Amido de milho	397,486	g	Amido de milho	364,236	g	Amido de milho	245,362	g
Caseína	200,000	g	Caseína	163,250	g	Caseína	52,570	g
Amido dextrinizado	132,000	g	Amido dextrinizado	132,000	g	Amido dextrinizado	132,000	g
Sacarose	100,000	g	Sacarose	100,000	g	Sacarose	100,000	g
			Farinha linhaça	175,000	g	Semente de soja	389,000	g
Banha	70,000	g	Banha	0,000	g	Banha	0,000	g
Celulose microcrist.	50,000	g	Celulose microc.	15,000	g	Celulose microc.	30,550	g
L-cistina	3,000	g	L-cistina	3,000	g	L-cistina	3,000	g
B. colina 41,1% colina	2,500	g	B. colina 41,1% colina	2,500	g	B. colina 41,1% colina	2,500	g
BHT	0,014	g	BHT	0,014	g	BHT	0,014	g
Mix mineral G	35,000	g	Mix mineral G	35,000	g	Mix mineral G	35,000	g
Mix vitamínico	10,000	g	Mix vitamínico	10,000	g	Mix vitamínico	10,000	g
<b>TOTAL</b>	<b>1000,00</b>	<b>g</b>	<b>TOTAL</b>	<b>1000,00</b>	<b>g</b>	<b>TOTAL</b>	<b>1000,00</b>	<b>g</b>

Fornecedor: PRAGSOLUÇÕES Biociências, Jauá/SP. E-mail: [contato@pragsolucoe.com.br](mailto:contato@pragsolucoe.com.br)  
 Responsável Técnico: José Sebastião Corrêa Neto.