



Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

EFEITOS DA DIETA À BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA NA
DOENÇA CORONARIANA ISQUÊMICA

MARTINE ELISABETH KIENZLE HAGEN

Porto Alegre

2006

MARTINE ELISABETH KIENZLE HAGEN

**EFEITOS DA DIETA À BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA NA
DOENÇA CORONARIANA ISQUÊMICA**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Instituto de Ciências Básica da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriane Belló-Klein

Porto Alegre

2006

MENSAGEM

Graças dou por esta vida, pelo bem que revelou.
Graças dou por meu futuro e por tudo que passou,
pelas bênçãos derramadas, pela dor, e na aflição,
pelas graças reveladas; graças dou por teu perdão.

Graças pelo azul celeste e por nuvens que há também,
pelas rosas no caminho e os espinhos que elas têm,
pela escuridão da noite, pela estrela que brilhou,
pela prece respondida e a esperança que falhou.

Pela cruz e o sofrimento e a feliz ressurreição,
pelo amor que é sem medida, pela paz no coração,
pela lágrima vertida e o consolo que é sem par,
pelo dom da eterna vida – sempre graças hei de dar.

TACK, O GUD, FOER VAD SOM VARIT – August Ludwig Storm, 1891, Suécia.
Trad. Alice O. Denyszcuk, 1961. Mel. TACKSAEGELSE – August Ludwig
Storm, 1891. Hinário Luterano.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Adriane Belló-Klein pelas orientações, paciência, incentivo constante ao longo deste trabalho e por ser exemplo de professora;

À Prof^a. Dr^a. Susana Llesuy pelas orientações no desenvolver deste trabalho;

Ao Everton, companheiro da minha vida, pelo apoio, compreensão, incentivo e por me substituir no cuidado com nossos filhos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

À minha família pelo apoio e compreensão;

À Tânia Regina Gatteli pelo auxílio na realização das cirurgias e experimentos;

Ao prof. Marcos Luiz dos Santos Perry e à prof^a Erna Vogt pelas orientações na padronização das dietas dos animais;

Aos colegas de laboratório Ana Raquel Lehenbauer, Ana Carolina Paludo, Paulo Cavalheiro Schenkel, Lessane Gonçalves e Rafaela Caron pelo auxílio ao longo do tratamento dos animais e na realização dos experimentos.

*Dedico este trabalho ao meu marido Everton e aos meus filhos
Ricardo e Tiago com amor e carinho.*

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| Lista de Figuras..... | X |
| Lista de Tabelas..... | XII |
| Lista de Abreviaturas..... | XIII |
| RESUMO..... | XVI |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Doença Cardiovascular: Infarto do Miocárdio e Insuficiência Cardíaca..... | 1 |
| 1.1.1. Insuficiência Cardíaca: Conceito..... | 5 |
| 1.1.2. Insuficiência Cardíaca: Etiologia..... | 6 |
| 1.1.3. Insuficiência Cardíaca: Fisiopatologia..... | 7 |
| 1.2. Espécies Ativas de Oxigênio..... | 8 |
| 1.3. Estresse Oxidativo..... | 14 |
| 1.4. Sistema Antioxidante Enzimático..... | 16 |
| 1.5. Sistema Antioxidante Não-Enzimático..... | 20 |
| 1.6. Estresse Oxidativo na Insuficiência Cardíaca..... | 20 |
| 1.7. Alimentos Derivados da Soja..... | 24 |
| 1.7.1. Efeitos Benéficos do Consumo da Soja à Saúde..... | 24 |
| 1.7.2. Isoflavonas da Soja..... | 25 |
| 1.7.3. Proteção Cardiovascular por Isoflavonas da Soja..... | 32 |
| 2. HIPÓTESE..... | 37 |
| 3. OBJETIVOS..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1 Objetivo Geral..... | 38 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 38 |
| 4. MATERIAL e MÉTODOS..... | 40 |
| 4.1. Análise do Conteúdo de Isoflavonas no GS e na PIS..... | 40 |
| 4.2. Experimentos <i>in vitro</i> | 41 |
| 4.2.1. Análise da Reatividade e da Capacidade Antioxidante Total em GS e PIS..... | 41 |
| 4.2.1.1. Reatividade Antioxidante Total (TAR)..... | 42 |
| 4.2.1.2. Capacidade Antioxidante Total (TRAP)..... | 43 |
| 4.2.2. Preparo do Homogeneizado de Fígado de Ratos e Dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico..... | 45 |
| 4.3. Experimentos <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> | 46 |
| 4.3.1 Composição da Dieta..... | 47 |
| 4.4. Grupos Experimentais..... | 51 |
| 4.5. Protocolo Experimental..... | 53 |
| 4.6. Avaliação Nutricional..... | 55 |
| 4.7. Indução ao Infarto do Miocárdio..... | 55 |
| 4.8. Avaliações Hemodinâmicas..... | 58 |
| 4.8.1. Registro das Pressões Ventriculares Esquerdas e Aórticas..... | 58 |
| 4.8.2. Análise da Pressão Ventricular Esquerda..... | 59 |
| 4.8.3. Análise dos Índices de Relaxamento e de Contratilidade Ventricular..... | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9. Coleta de sangue..... | 60 |
| 4.10. Índice de Hipertrofia Cardíaca..... | 61 |
| 4.11. Análise da Área de Infarto..... | 61 |
| 4.12. Preparações do Homogeneizado de Tecido Cardíaco..... | 62 |
| 4.13. Nível de Congestão Hepática e Pulmonar..... | 63 |
| 4.14. Avaliações Bioquímicas | 63 |
| 4.14.1. Quimiluminescência iniciada por tBOOH..... | 63 |
| 4.14.2. Dosagem de Carbonilas..... | 65 |
| 4.14.3. Dosagem da Atividade das Enzimas Antioxidantes..... | 66 |
| 4.14.3.1. Superóxido Dismutase..... | 66 |
| 4.14.3.2. Catalase..... | 67 |
| 4.14.3.3. Glutathione Peroxidase..... | 68 |
| 4.14.4. Análise de Nitritos e Nitratos..... | 69 |
| 4.15. Método de Lowry..... | 71 |
| 4.16. Análise Estatística..... | 71 |
| 5. RESULTADOS..... | 73 |
| 5.1. Resultados dos experimentos in vitro..... | 73 |
| 5.1.1. Conteúdo de Isoflavonas no GS e na PIS..... | 73 |
| 5.1.2. Reatividade Antioxidante Total e Capacidade Antioxidante Total do GS e da PIS..... | 75 |
| 5.1.3. Percentual de Inibição de TBA-RS em Homogeneizado de Fígado de Ratos Incubados com GS e PIS..... | 77 |

| | |
|--|------------|
| 5.2. Resultados dos Experimentos in vivo..... | 79 |
| 5.2.1 Consumo Alimentar Diário..... | 79 |
| 5.2.2. Mortalidade dos Animais pós-infarto..... | 81 |
| 5.2.3 Parâmetros Biométricos e Morfométricos..... | 84 |
| 5.2.4. Parâmetros Hemodinâmicos..... | 86 |
| 5.2.5 Estresse Oxidativo no Miocárdio..... | 88 |
| 5.2.5.1. Enzimas Antioxidantes..... | 88 |
| 5.2.5.2. Dano Oxidativo a Proteínas e a Lipídios..... | 90 |
| 5.2.6. Correlações de Pearson..... | 92 |
| 5.2.7. Parâmetros Avaliados em Eritrócitos e Plasma..... | 94 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 97 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 107 |
| 8. PERSPECTIVAS FUTURAS | 108 |
| REFERÊNCIAS | 109 |
| APÊNDICE A – ARTIGO 1..... | 142 |
| APÊNDICE B – ARTIGO 2..... | 166 |
| ANEXO 1 – ANÁLISE DE PROTEÍNAS..... | 192 |
| ANEXO 2 – ANÁLISE DE ISOFLAVONAS | 194 |
| ANEXO 3 – CÁLCULO DE EQUIVALENTES DE ISOFLAVONAS AGLICONAS..... | 196 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Formação das EAO, a partir da redução do O ₂ | 9 |
| Figura 2. Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados..... | 11 |
| Figura 3. Estrutura química das isoflavonas agliconas encontradas na soja: gliciteína, genisteína e daidzeína..... | 26 |
| Figura 4. Esquema de absorção e metabolismo das isoflavonas..... | 29 |
| Figura 5. Gaiola metabólica e gaioleiro ao fundo..... | 47 |
| Figura 6. Ilustração do procedimento cirúrgico de ligadura da artéria coronária esquerda – oclusão da circulação coronariana no ventrículo esquerdo..... | 57 |
| Figura 7. Sistema de aquisição de dados de pressão sistólica ventricular esquerda, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e pressão aórtica média | 59 |
| Figura 8. A – Reatividade Antioxidante Total do gérmen de soja e da proteína isolada de soja. B – Capacidade Antioxidante Total do gérmen de soja e da proteína isolada de soja..... | 76 |
| Figura 9. Percentual de Inibição de TBA-RS | 78 |
| Figura 10. Curva de consumo médio de ração..... | 81 |
| Figura 11. Corações e análise histológica do tecido cardíaco de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Grupo controle) e à cirurgia de ligadura da artéria coronária (infartado)..... | 83 |

Figura 12. Efeito de 9 semanas de tratamento dietético sobre o dano oxidativo em homogeneizado de músculo cardíaco dos diferentes grupos experimentais. A – Dano oxidativo às proteínas. B – Dano oxidativo a lipídios.....91

Figura 13. Correlações entre a PDFVE e parâmetros de estresse oxidativo. A – Correlação entre PDFVE e QL dos animais tratados com caseína. B – Correlação entre PDFVE e concentração de carbonilas dos grupos.....93

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Composição da dieta controle e experimental por quilo de ração..... | 48 |
| Tabela 2 – Comparação entre o conteúdo de aminoácidos do Samprosoy 90LH e o padrão de referência para aminoácidos essenciais da FAO/WHO..... | 51 |
| Tabela 3 – Protocolo experimental do estudo in vivo dos animais a partir da 3 ^a semana de vida até a 12 ^a semana de vida..... | 54 |
| Tabela 4 – Conteúdo de isoflavonas (mg/ 100g de produto) em gérmen de soja e proteína isolada de soja | 74 |
| Tabela 5 – Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos experimentais após 9 semanas de tratamento dietético..... | 85 |
| Tabela 6 – Parâmetros hemodinâmicos dos diferentes grupos experimentais após 9 semanas de tratamento dietético..... | 87 |
| Tabela 7 – Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em homogeneizado de músculo cardíaco dos diferentes grupos experimentais após 9 semanas de tratamento dietético. | 99 |
| Tabela 8 - Efeito de 9 semanas de tratamento dietético sobre parâmetros avaliados no plasma e eritrócitos dos grupos experimentais..... | 96 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ATP | trifosfato de adenosina |
| ABAP | 2'- azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloreto |
| CAT | catalase |
| CI<25% | grupo caseína com área de infarto inferior a 25% |
| CI>25% | grupo caseína com área de infarto superior a 25% |
| CPS | contagens por segundo |
| CS | grupo caseína sham |
| + dP/dt | derivada de contratilidade ventricular |
| - dP/dt | derivada de relaxamento ventricular |
| DCV | doença cardiovascular |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DNPH | 2,4 dinitro fenil hidrazina |
| EAN | espécies ativas de nitrogênio |
| EAO | espécies ativas de oxigênio |
| EMBRAPA | Empresa brasileira de pesquisa agropecuária |
| FAD | flavina adenina dinucleotídeo |
| FDA | food and drug administration |
| G6P | glicose-6-fosfato |
| G6PDH | glicose-6-fosfato desidrogenase |
| GPx | glutathione peroxidase |
| GR | glutathione reductase |
| GS | gérmen de soja |
| GSH | glutathione (forma reduzida) |
| GSSG | glutathione (forma oxidada) |

| | |
|-------------------------------|--|
| H ⁺ | íon hidrogênio |
| HDL | lipoproteína de alta densidade |
| H ₂ O | água |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| HO [•] | radical hidroxila |
| IC | insuficiência cardíaca |
| IM | infarto do miocárdio |
| KCl | cloreto de potássio |
| LDL | lipoproteína de baixa densidade |
| LPO | lipoperoxidação |
| MDA | malondialdeído |
| MnSOD | manganes superóxido dismutase |
| NAD ⁺ | nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada) |
| NADH | nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida) |
| NADP ⁺ | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada) |
| NADPH | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida) |
| NO [•] | óxido nítrico |
| O ₂ | oxigênio molecular |
| O ₂ ^{•-} | ânion superóxido |
| O-DMA | O-desmetilangolesina |
| OH ⁻ | ânion hidroxila |
| ONOO [•] | peroxinitrito |
| Oz | onças (medida de volume) |
| PAM | pressão arterial média |
| PDCAAS | pontuação de aminoácidos corrigida pela digestibilidade de proteínas |
| PIS | proteína isolada de soja |

| | |
|----------|---|
| PMSF | fluoreto de fenilmetilsulfonila |
| PSVE | pressão sistólica do ventrículo esquerdo |
| PDFVE | pressão diastólica final do ventrículo esquerdo |
| QL | quimiluminescência |
| RL | radical livre |
| -SH | grupamento sulfidrila |
| SI < 25% | grupo soja com área de infarto inferior a 25% |
| SI > 25% | grupo soja com área de infarto superior a 25% |
| SOD | superóxido dismutase |
| SS | grupo soja sham |
| SUS | sistema único de saúde |
| TBA-RS | substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TCA | ácido tricloroacético |
| TI | tempo de indução |
| TRAP | potencial antioxidante total |
| TAR | reatividade antioxidante total |

RESUMO

Recentes estudos têm vinculado a ingestão de dietas à base de proteína de soja com a redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares. Esse efeito vem sendo diretamente relacionado às isoflavonas da soja, encontradas principalmente sob as formas genisteína, daidzeína e gliciteína.

Um dos objetivos deste estudo foi analisar o conteúdo de isoflavonas em dois produtos derivados da soja e sua eficácia como antioxidantes *in vitro* e investigamos, também, o efeito *in vivo* do tratamento com dieta à base de proteína de soja, durante 9 semanas, em ratos submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio.

O conteúdo de isoflavonas foi analisado no germen de soja (GS) e na proteína isolada de soja (PIS) através de HPLC. A qualidade e a quantidade de antioxidantes presentes nas amostras foram quantificadas pelos métodos de reatividade antioxidante total (TAR) e de capacidade antioxidante total (TRAP). Foi analisado o poder antioxidante do GS e da PIS medindo-se o percentual de inibição da lipoperoxidação (LPO) pelo método de TBA-RS em homogeneizado de fígado de ratos submetidos a um sistema gerador de radicais livres *in vitro*. Identificamos que o GS apresentou 9 vezes mais quantidade de daidzina do que a PIS que, por sua vez, apresentou 4,5 vezes mais

quantidade de genisteína do que o GS. O GS mostrou reatividade antioxidante total três vezes maior do que a PIS, mas ambos os produtos apresentaram os mesmos níveis de antioxidantes. Os dois produtos inibiram a LPO na mesma proporção (81% e 79%, para GS e PIS, respectivamente).

Na investigação *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar machos que receberam água e dieta contendo PIS ou caseína (17% de proteína) *ad libitum*, a partir da 3^a semana até a 12^a semana de vida, subdivididos em 6 grupos: Caseína Controle: submetidos à cirurgia fictícia de infarto do miocárdio, alimentados com dieta à base de caseína. Caseína Infarto<25%: submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto inferior a 25%, alimentados com dieta à base de caseína. Caseína Infarto>25%: submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto superior a 25%, alimentados com dieta à base de caseína. Soja Controle: submetidos à cirurgia fictícia de infarto do miocárdio, alimentados com dieta à base de PIS. Soja Infarto<25%: submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto inferior a 25%, alimentados com dieta à base de PIS. Soja Infarto>25%: submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto superior a 25%, alimentados com dieta à base de PIS. A cirurgia de infarto foi realizada na quinta semana de

tratamento e, quatro semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao cateterismo cardíaco para avaliação hemodinâmica da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índices de contratilidade e relaxamento ($\pm dP/dt$) e a pressão aórtica média (PAM). Imediatamente após a avaliação hemodinâmica, os animais foram sacrificados por decapitação, o coração foi extraído e determinada a área de infarto. O fígado, os pulmões e o tecido adiposo abdominal (gordura perirrenal, epididimal e mesentérica) e tecido adiposo marrom (da região interescapular) foram dissecados e pesados e o nível de congestão hepática e pulmonar determinado. Foram coletadas amostras de sangue para a realização das medidas de concentração plasmática de nitritos e nitratos, e em eritrócitos foram feitas medidas de lipoperoxidação (LPO) e de enzimas antioxidantes: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). Em homogeneizado de músculo cardíaco, foram realizadas as técnicas de determinação da quimiluminescência (QL), da concentração de carbonilas e da atividade das enzimas: CAT, SOD e GPx. Os animais infartados alimentados com caseína apresentaram hipertrofia cardíaca, congestão hepática e pulmonar, aumento da PDFVE e da $-dP/dt$, diminuição da PSVE, $+dP/dt$ e da PAM, sinais típicos de Insuficiência Cardíaca (IC). A dieta à base de PIS foi capaz

de prevenir a congestão pulmonar nos dois grupos infartados e prevenir a congestão hepática no grupo SI<25%, melhorar a função ventricular sistólica e diastólica e diminuir o estresse oxidativo cardíaco e sistêmico dos ratos infartados. A disfunção ventricular foi correlacionada com o aumento do dano oxidativo no miocárdio como mostram os resultados de QL e de concentração de carbonilas (aumento de 3 e 10 vezes, respectivamente) nos grupos infartados. Verificamos que os ratos alimentados com PIS apresentaram maior atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio do que os animais alimentados com caseína, a SOD aumentou 72% e a CAT e a GPx em 24% e a QL diminuiu.

No plasma, a alimentação à base de PIS aumentou os níveis de nitritos e nitratos e, em eritrócitos, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes quando comparada à alimentação à base de caseína.

Este trabalho demonstra, pela primeira vez, uma melhora da função ventricular pós-infarto do miocárdio, evitando a progressão ao estágio de IC severa, pela administração dietética de PIS de forma preventiva.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Doença Cardiovascular: Infarto do miocárdio e Insuficiência Cardíaca

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares (DCV) constituem a principal causa de mortalidade no mundo e estão aumentando em ritmo acelerado, sem distinção de região ou classe social; 16,7 milhões de pessoas morreram devido à doença no mundo em 2002 e, destes, 7,2 milhões de pessoas morreram devido à doença coronariana. Na Europa, as DCV são responsáveis por mais de 4 milhões de mortes a cada ano e a previsão para o ano de 2020 é de mais de 40% do total de óbitos da população mundial relacionados à DCV (WHO, 2004).

De acordo com a pesquisa americana National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES - CDC/NCHS, 1999–2002), dos 70,1 milhões de americanos que apresentaram DCV, 27 milhões tinham idade igual ou superior a 65 anos. A doença coronariana afetava 13 milhões dos pacientes, dos quais 7,1 milhões apresentaram infarto do miocárdio (IM) e 4,9 milhões apresentaram insuficiência cardíaca (IC) (AHA, 2005).

No Brasil, as DCV estão entre os fatores mais importantes no desenvolvimento de outras doenças crônicas não-transmissíveis e são de grande impacto social e anos produtivos de vida perdidos (LESSA, 1998). A doença coronariana é a segunda causa de morte por DCV no Brasil, sendo que o IM representou de 75 a 85% das DCV no período de 1980 a 1999 (LESSA, 2003).

Em 2002, a IC foi a terceira causa de internação hospitalar (372,6 mil) no Brasil, após a pneumonia (794,26 mil) e asma (376,45 mil). Das 372,6 mil pessoas internadas, 110,9 mil (29,8%) tinham entre 20-59 anos com predominância do sexo masculino, enquanto que a faixa etária igual ou superior a 60 anos totalizou 255,98 mil internações (68,70%), com predominância do sexo feminino (130,83 mil internações). Do total de internações hospitalares em 2002, foram registradas 335,1 mil mortes (2,86%), das quais 85,6 mil (25,54%) devido à DCV e 25,98 mil (7,7%) devido à IC. Cerca de 30 a 40% dos pacientes com IC têm como fator etiológico o IM (ALBANESI FILHO, 2005).

A IC representa um importante problema de saúde pública, considerando a crescente prevalência, a morbidade e os altos índices de hospitalizações associados à doença. O custo sócio-econômico é elevado, envolvendo dispêndio com medicamentos, internações repetidas, perda de produtividade, aposentadorias precoces,

eventuais cirurgias e, ocasionalmente, transplante cardíaco (SBC, 1999).

Um das principais causas do desenvolvimento da IC é o IM. O IM significa, basicamente, a morte dos cardiomiócitos causada por isquemia prolongada (GANONG, 1998) e determina importante alteração da arquitetura ventricular, envolvendo tanto a região infartada quanto a não infartada. Seguindo-se à oclusão coronariana, ocorre um conjunto de adaptações: alterações na composição, massa, volume e geometria cardíaca, chamado de remodelamento cardíaco (SUTTON e SHARPE, 2000).

Uma das características mais marcantes do remodelamento cardíaco é a progressiva queda da função ventricular. Inicialmente, em consequência do crescimento celular, o remodelamento pode contribuir para manter ou restaurar a função cardíaca. Cronicamente, entretanto, ocorrem alterações estruturais, bioquímicas e genéticas que resultarão em disfunção ventricular progressiva (SUTTON e SHARPE, 2000).

Os estudos em animais têm contribuído para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), tais como: disfunção miocárdica, remodelamento ventricular, alterações hemodinâmicas, ativação neuro-humoral,

expressão de citocinas, disfunção endotelial e estresse oxidativo (HASENFUSS, 1998).

O modelo experimental de infarto (ligadura da artéria coronária esquerda) é freqüentemente utilizado como modelo de IC. Este procedimento é comparável à situação clínica de IM em humanos (PFEFFER et al., 1979).

Embora a mortalidade desse procedimento cirúrgico seja elevada (50% nas primeiras 48 horas), o sistema cardiovascular dos animais infartados sofre alterações hemodinâmicas e morfológicas que se assemelham às encontradas na IC em humanos (KOMPA e SUMMERS, 2000; MONNET e CHACHQUES, 2005). Estas alterações incluem dilatação do ventrículo esquerdo, redução na função sistólica e aumento nas pressões de enchimento. A progressão da disfunção ventricular esquerda e a falência miocárdica estão associadas com a ativação neuro-humoral também similar à encontrada em humanos (HASENFUSS, 1998).

De acordo com os dados do Sistema Único de Saúde (SUS), a IC acomete 2 milhões de pacientes, com uma incidência de 240 mil novos casos por ano. Embora inúmeros avanços em pesquisas no sentido da prevenção e tratamento das manifestações clínicas que culminam com a IC tenham sido alcançados, esta doença permanece

sendo responsável por um alto índice de morbidade e mortalidade da população mundial (SBC, 1999).

1.1.1 – Insuficiência Cardíaca: Conceito

A IC é definida como a incapacidade do coração em bombear o suprimento adequado de sangue em relação ao retorno venoso e às necessidades metabólicas tissulares, ocasionando redução do débito cardíaco e elevação da pressão pulmonar e venosa sistêmica. Contudo, este conceito de falência da bomba cardíaca vem sendo ampliado. Atualmente, a IC é descrita como uma síndrome em que ocorre importante estimulação neurohumoral, caracterizada pela ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona, redução da atividade do sistema nervoso parassimpático, além de alterações da musculatura cardíaca e esquelética. O resultado disto é uma síndrome clínica complexa com comprometimento de múltiplos órgãos, manifestando sintomas como fadiga, dispnéia, diminuição de força muscular e congestão de órgãos (SINGAL et al., 2000).

1.1.2 – Insuficiência Cardíaca: Etiologia

A doença coronariana e a hipertensão arterial sistêmica isoladas ou em conjunto contribuem para a grande maioria dos casos de IC do mundo desenvolvido. As doenças valvulares são muito menos freqüentes como etiologia subjacente da doença. Uma minoria substancial de casos é considerada de etiologia desconhecida e o termo aplicado é cardiomiopatia, identificado fisiologicamente pelo termo dilatada (Mc MURRAY e DARGIE, 1998; McCALL, 1995).

A IC pode ser causada por diversos fatores tais como, hipertensão, IM, defeitos na ação de válvulas cardíacas e cardiomiopatias idiopáticas, assim como, por conseqüências secundárias de determinadas doenças como a diabetes ou intervenções com fármacos como quimioterápicos (HO et al., 1993).

Estes dados são, com certeza, motivadores para o grande número de pesquisas desenvolvidas na área da saúde. Muito já se sabe a respeito de diagnósticos e agentes causadores, mas os verdadeiros fatores e os processos que desencadeiam IC permanecem desconhecidos.

1.1.3 – Insuficiência Cardíaca: Fisiopatologia

Independente do fator etiológico determinante da IC, uma série de alterações hemodinâmicas e neurohumorais envolvendo o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona estão presentes na IC grave. A ativação neurohumoral caracteriza a IC. A ativação dos sistemas neurohumorais, especialmente o sistema nervoso simpático está relacionada com a progressão da doença e é fator prognóstico para mortalidade, refletindo mecanismos periféricos compensatórios ao baixo rendimento cardíaco (DZAU e RE, 1994).

Dois processos podem ser encontrados na fisiopatologia da IC: disfunção sistólica ou disfunção diastólica. A disfunção sistólica resulta do comprometimento da contratilidade ventricular com conseqüente aumento do volume sistólico final e redução da fração de ejeção ventricular. Esta situação é encontrada em indivíduos com perda importante de músculo cardíaco viável, como o que acontece após o IM. A disfunção diastólica apresenta-se em decorrência da diminuição da complacência ventricular, limitando o enchimento diastólico e levando à congestão venosa (Mc ALLISTER e TEO, 1997).

Além disso, estudos experimentais têm demonstrado o aumento na formação de radicais livres e a associação do estresse oxidativo

com o déficit na reserva antioxidante endógena na IC (HILL e SINGAL, 1996).

1.2 – Espécies Ativas de Oxigênio

As espécies ativas de oxigênio (EAO) estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou de gerarem radicais livres (YU, 1994).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A formação destes compostos é estabelecida pela perda, ganho de um elétron, fissão homolítica de uma ligação covalente, em que cada um dos átomos fica com um elétron desemparelhado. Cabe ressaltar, que o oxigênio molecular é um birradical, muito embora sua reatividade seja baixa porque seus dois elétrons desemparelhados têm spins paralelos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).

A geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica. Dentre os quais, podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria. Geralmente, o oxigênio (O_2) é reduzido até água (H_2O),

recebendo quatro elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase. Entretanto, em razão de sua configuração eletrônica, o O_2 pode receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente reativos (Figura 1). Destes compostos intermediários, pode-se destacar: o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). A formação destas moléculas ocorre em aproximadamente 5% de todo processo de redução do O_2 até água. O estado excitado do O_2 denominado de oxigênio "singlet", também pode causar danos à célula (DEL MAESTRO, 1980; YU, 1994).

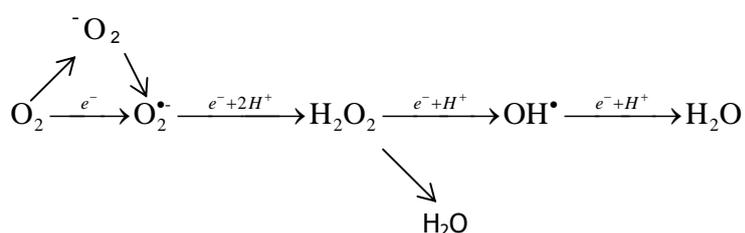
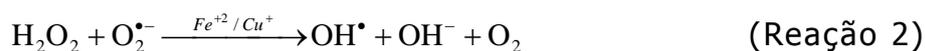
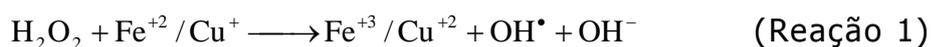


Figura 1: Formação das EAO, a partir da redução do O_2 .

O $O_2^{\bullet-}$ é o primeiro intermediário da redução monovalente do O_2 à água. A sua dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (YU, 1994). O H_2O_2 é o segundo intermediário do processo oxidativo, podendo ser produzido indiretamente, pela redução univalente do O_2 , seguida da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ e/ou diretamente, pela redução bivalente do O_2 molecular. Apesar de não

ser um radical livre, esta espécie ativa pode originar o OH•, o que seria bastante prejudicial à célula (DEL MAESTRO, 1980). O OH•, por sua vez, é um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos, sua formação pode se dar de acordo com a reação de Fenton (Reação 1), reação do H₂O₂ com íons de ferro ou de cobre, e a reação de Haber-Weiss (Reação 2), reação do H₂O₂ com o O₂•⁻ na presença de íons metálicos (YU, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).



Cada EAO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida (DEL MAESTRO, 1980; YU, 1994). Na Figura 2, podemos observar que a molécula diatômica de O₂ é um radical livre, mas possui spins paralelos, o que dificulta a reação química com outras moléculas e torna o O₂ mais estável quimicamente. As formas de O₂ mais reativas são os oxigênios "singlets" Δ e Σ, que não possuem restrição de "spin" e por isso são muito mais reativas que o O₂ molecular no estado fundamental (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

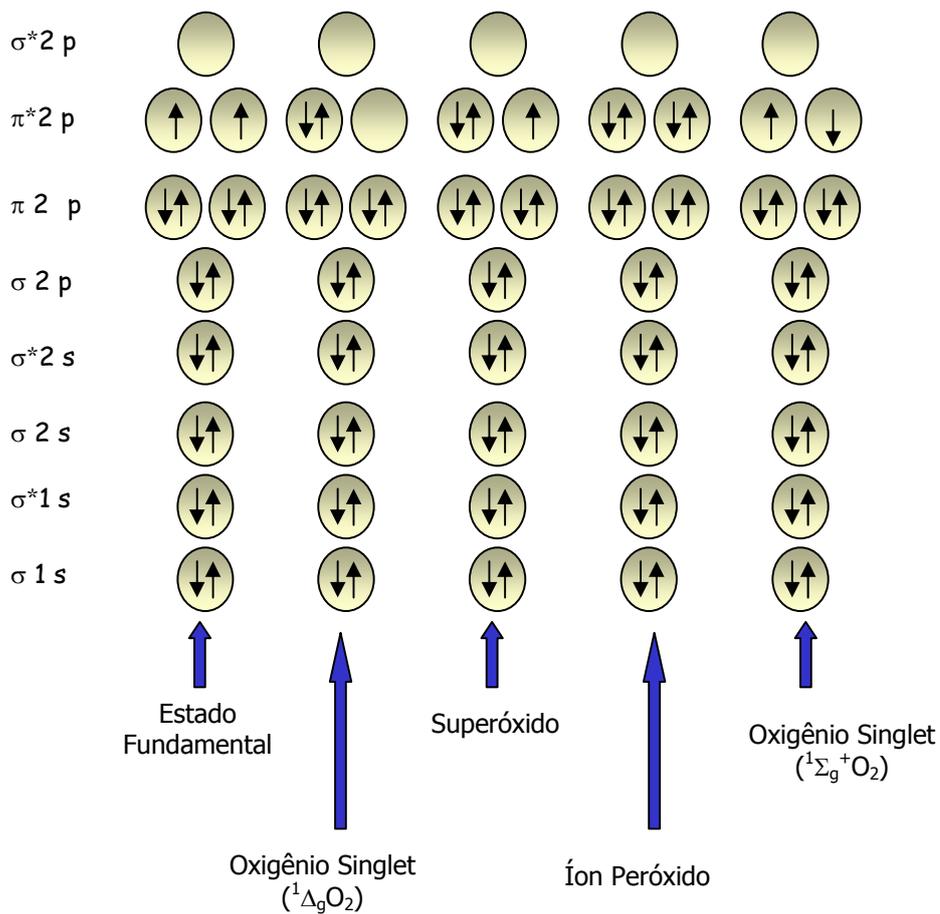


Figura 2: Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados (modificado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Outras fontes de EAO compreendem não só as ações enzimáticas da ciclooxigenase, lipooxigenase, xantina oxidase, aldeído oxidase, mas também a autooxidação das catecolaminas, das flavinas e ferridoxinas, além das reações catalisadas por metais de

transição, como ferro e cobre (DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A magnitude da reatividade das EAO está relacionada com seus elétrons desemparelhados que lhes conferem a instabilidade característica. As reações com os radicais são muito rápidas e ocorrem em cadeia, já que os elétrons desemparelhados favorecem as colisões moleculares. Desta forma, as reações são propagadas rapidamente (SOUTHORN e POWIS, 1988).

O potencial reativo das EAO é bem ilustrado na peroxidação dos lipídios (LPO) de membrana. A LPO é um processo sucessivo e fisiológico que envolve não somente a renovação das membranas celulares, como também a biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos (MENEHINI, 1987). As membranas celulares são preferencialmente atacadas, porque são formadas por lipídios de cadeias insaturadas e por proteínas com grupos tióis (-SH) (MENEHINI, 1987; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). As reações de lipoperoxidação ocorrem numa série de etapas, das quais se destacam as seguintes: iniciação, propagação e terminação.

Na fase de iniciação, o OH^\bullet ou o oxigênio "singlet" ataca a molécula orgânica, abstraindo-lhe um átomo de hidrogênio, gerando um radical centrado no carbono, cuja estabilidade se faz pelo rearranjo das ligas duplas, formando o dieno conjugado. Este, por

sua vez, combina-se com o O_2 e produz o radical peroxil. Com o radical peroxil, inicia-se a fase de propagação da LPO, uma vez que este remove um átomo de hidrogênio de um lipídio adjacente, gerando um lipoperóxido e um outro radical centrado no carbono (que poderá reagir com o O_2 e propagar a reação). A reação acaba quando dois radicais reagirem entre si e formarem um tetróxido. Este último pode se degradar em O_2 "singlet" e em carbonilas excitadas, devido a sua alta instabilidade. Esta é a etapa denominada de terminação. Essas espécies quando voltam ao seu estado fundamental emitem luz no comprimento de onda visível, caracterizando o fenômeno de quimiluminescência (QL), que se constitui num importante método para análise e quantificação da LPO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; THOMAS, 1997).

Os efeitos da LPO podem ser observados pela mudança não somente no ambiente lipídico das membranas biológicas (modificações na fluidez e na seletividade), mas também pelas alterações de suas proteínas (receptores e canais iônicos) (YU, 1994).

As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EAO, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação, agregação, além da maior susceptibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações

dos radicais livres sobre as proteínas (YU, 1994). Pode haver, também, um ataque ao DNA nuclear, sobretudo pelo OH^\bullet , formando bases oxidadas do DNA como a 8-hidroxideoxiguanosina, que pode ser detectada experimentalmente. O DNA mitocondrial também é bastante atingido, uma vez que a mitocôndria é a grande fonte de EAO (YU, 1994).

Muitas são as evidências de que as EAO provocam ou influenciam inúmeros processos orgânicos degenerativos como a catarata, o enfisema, a artrite, a doença de Parkinson, a porfiria aguda intermitente, a lesão isquêmica e até mesmo a mutação, o câncer e o envelhecimento (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Além disso, diversas enzimas têm sua atividade modulada por radicais livres como a aconitase, diversas hidratases e desidratases (GARDNER et al., 1995).

1.3 - Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como "um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes, levando ao dano potencial" (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de: (1) Diminuição dos antioxidantes – por exemplo: diminuição da atividade

das enzimas de defesa ou a deficiência nutricional de antioxidantes ou outros constituintes dietéticos essenciais pela inadequada ingestão ou absorção dos nutrientes da dieta (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, flavonóides, aminoácidos contendo enxofre necessário para a síntese de glutathione, ou riboflavina, necessária para a produção de FAD, um cofator da glutathione redutase); (2) – Produção aumentada de EAO ou Espécies Ativas de Nitrogênio (EAN), pela exposição elevada ao O₂, à presença de toxinas que são metabolizadas produzindo EAO/EAN, ou excessiva ativação de sistemas “naturais” de produção de EAO/EAN como a ativação indevida de células fagocíticas nas doenças crônicas inflamatórias, como artrite reumatóide ou colite ulcerativa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O estresse oxidativo pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O principal alvo celular do estresse oxidativo pode variar dependendo da célula, do tipo de estresse imposto e da sua intensidade; quando intenso, pode produzir danos irreversíveis levando à morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os organismos aeróbios possuem um sistema de defesa para proteger-se contra os efeitos causados pelas EAO, chamado de sistema antioxidante e constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos que atuam conjuntamente na proteção celular. O

sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 . Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (YU, 1994).

Quando a substância age neutralizando as EAO na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de "scavenger". Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de "quencher" (SIES e MURPHY, 1991; HALLIWELL, 1997).

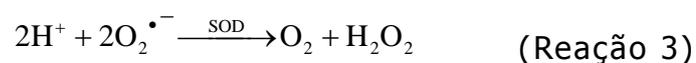
1.4 – Sistema Antioxidante Enzimático

As enzimas antioxidantes evitam o acúmulo de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, para que não haja a produção do OH^{\bullet} , contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa (YU, 1994).

As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).

A SOD atua como primeira linha de defesa antioxidante. Sua função é dismutar o $O_2^{\bullet-}$ (EAO gerada no primeiro passo do processo de redução monovalente do oxigênio). A reação catalítica visa transformar dois $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Reação 3). Essa dismutação ocorre

naturalmente em pH fisiológico, porém, em uma velocidade bem menor em relação àquela catalisada pela enzima (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).

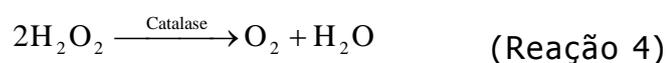


A SOD é classificada em três tipos distintos: SOD cobre e zinco, presente no citoplasma das células de eucariontes; SOD manganês, localizada na matriz mitocondrial e SOD ferro que ocorre em bactérias (YU, 1994).

Estas enzimas, presentes em quase todos os organismos vivos, fazem parte de um sistema de defesa essencial para a sobrevivência em condições aeróbias. O papel deletério do $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante a isquemia, que ocorre em transplante de órgãos, muitas intervenções cirúrgicas e durante acidentes vasculares no cérebro e coração, sugerem um uso clínico potencial para a SOD. Este fato motivou a comunidade científica a desenvolver mais pesquisas sobre SOD, uma vez que, a SOD humana tem curto tempo de meia-vida (menor que 10 minutos), e não penetra nas células (GOLDSTEIN e CZAPSKI, 1996). Portanto, a modulação da atividade da SOD, por ser extracelular, pode ser utilizada no tratamento de doenças vasculares, como a

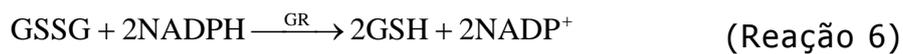
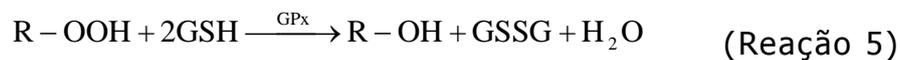
arteriosclerose (LUOMA et al, 1998).

A CAT tem uma ação bastante específica, já que atua apenas em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (CHANCE et al., 1979). Está distribuída em todos os órgãos, tendo níveis de atividade que podem variar em diferentes tecidos (fígado, rins, hemácias) e dentro de uma mesma célula (YU, 1994), mas aparece, preferencialmente, compartimentalizada nos peroxissomas. Órgãos como coração, pulmão e cérebro são mais susceptíveis aos danos oxidativos, pois possuem poucos peroxissomas e, portanto, menor concentração desta enzima. Cabe salientar, que nesses órgãos o H_2O_2 pode atravessar as membranas celulares e se difundir no sangue, onde poderá sofrer a ação da CAT eritrocitária (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O H_2O_2 , formado na dismutação do $O_2^{\bullet-}$, é transformado em água e oxigênio por ação desta enzima (Reação 4).



A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de H_2O_2 , assim como a catalase, e também hidroperóxidos orgânicos. A diferença entre estas duas enzimas é que a GPx é mais efetiva em baixas concentrações de H_2O_2 (TSUTSUI et al., 2001, SINGAL et al., 1999). Essa enzima catalisa a redução do H_2O_2 e de hidroperóxidos

orgânicos, através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que será, por sua vez, regenerada por ação da glutathiona redutase com consumo de NADPH (Reações 5 e 6). Neste processo de oxi-redução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água e formando glutathiona dissulfeto (GSSG) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).



Existem dois tipos de GPx: a selênio dependente e a selênio independente, encontrada em diferentes proporções no citosol e matriz mitocondrial. A GPx tem alta atividade no fígado e eritrócitos, onde ela foi descoberta, mas apresenta moderada atividade no coração e nos pulmões e baixa atividade no músculo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).

1.5 – Sistema Antioxidante Não-Enzimático

Por outro lado, existem as defesas não enzimáticas que podem ser divididas em: antioxidantes hidrofílicos (por exemplo: glutathione, vitamina C, indóis, catecóis) e lipofílicos (como: flavonóides, carotenóides, tocoferóis) (SIES e MURPHY, 1991; SIES, 1997). Dentre os hidrofílicos, a vitamina C tem papel relevante como antioxidante, sobretudo como “scavenger” e regenerador dos tocoferóis. Devido a sua característica hidrossolúvel possui alta capacidade de proteção do plasma sanguíneo contra a LPO. Em contrapartida, a propriedade lipossolúvel dos antioxidantes lipofílicos favorece sua ação nas membranas celulares, protegendo-as dos efeitos deletérios da LPO (YU, 1994).

1.6 – Estresse Oxidativo na Insuficiência Cardíaca

Embora a causa exata da IC não tenha sido completamente elucidada, devido aos múltiplos fatores envolvidos na sua progressão, vários estudos apontam para a participação de radicais livres e em especial das EAO na patogênese desta doença (HALLIWELL, 2000; YU, 1994; KHAPER E SINGAL, 1997).

Em sua revisão, Antozzi e Zeviani (1997) descreveram a importância das bases moleculares e bioquímicas para o entendimento de cardiomiopatias primárias e as subdividiram em dois grupos: 1) como resposta a desordens da contratilidade do miocárdio e de proteínas contráteis e 2) como desordens no metabolismo energético cardíaco, sendo os defeitos nos processos de fosforilação oxidativa na mitocôndria e no processo de beta oxidação, reconhecidamente as principais causas metabólicas da cardiomiopatia. Devido a estas alterações metabólicas, é possível inferir as conseqüentes alterações nos processos de oxi-redução que ocorrem na célula, e conseqüentemente no *status* de estresse oxidativo ao qual este órgão está submetido.

Muitas pesquisas com animais experimentais, assim como com seres humanos, evidenciaram o papel do estresse oxidativo na patogênese da IC. Este conceito tem sido aceito devido ao fato de que durante a IC, modificações em diferentes neurohormônios, citocinas, óxido nítrico e ativação de células inflamatórias estão vinculadas ao estresse oxidativo em nível celular e molecular. (SINGAL et al., 2000).

O IM em ratos tem sido muito utilizado como um modelo para estudar os efeitos da IC. A maior vantagem deste modelo é a possibilidade de manter os animais vivos por um longo período, até a

formação da cicatriz na região miocárdica infartada e o aparecimento dos sinais de remodelamento ventricular. Um dos modelos animais mais utilizados para estudo do IM é o modelo descrito por Pfeffer e colaboradores (1979) que reproduz as alterações observadas na IC pós-IM em humanos. Este modelo foi utilizado neste trabalho, sendo o IM induzido a partir da cirurgia de ligação da artéria coronária esquerda.

Usando o modelo animal de IM, Khaper e Singal (1997) submeteram os animais infartados (através da cirurgia de ligação da artéria coronária esquerda) ao tratamento com drogas vasodilatadoras (captopril e prazosin). Neste estudo, foram avaliadas as alterações na atividade das enzimas antioxidantes, nos parâmetros de estresse oxidativo, hemodinâmicos e morfométricos em 1, 4 e 16 semanas pós-IM. As alterações de congestão hepática e pulmonar foram identificadas apenas após 16 semanas pós-IM. As alterações hemodinâmicas verificadas 4 semanas pós-IM mostraram uma leve disfunção cardíaca e foram encontrados sinais hemodinâmicos de grave disfunção cardíaca em 16 semanas pós-IM. De acordo com essas variáveis, os autores sugeriram uma classificação progressiva para a IC, pois 1 semana pós-IM, não foram encontrados sinais de congestão hepática e pulmonar, nem alterações hemodinâmicas, caracterizando um estágio sem insuficiência. No entanto, o aumento

da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e a leve diminuição do pico da pressão sistólica do ventrículo esquerdo 4 semanas pós-IM, acompanhada por edema pulmonar e congestão hepática, mostraram um estágio de compensação funcional da IC. 16 semanas pós-IM, houve aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo com diminuição significativa do pico da pressão sistólica do ventrículo esquerdo associadas à congestão hepática e pulmonar, sugerindo um estágio de IC grave. Neste estudo também demonstraram uma relação entre o déficit antioxidante e a progressão da IC. A atividade das enzimas antioxidantes não foi alterada 1 semana pós-IM, mas 4 semanas pós-IM houve uma diminuição significativa da atividade das enzimas e 16 semanas pós-IM a redução da atividade das enzimas foi mais acentuada.

Outros estudos também demonstraram uma forte associação entre a IC e o estresse oxidativo. Após a cirurgia de ligação da artéria coronária esquerda, houve aumento significativo do estresse oxidativo no músculo cardíaco e em outros tecidos, como o músculo diafragmático (PALACE et al. 1999).

Tsutsui e colaboradores (2001), analisando miócitos cardíacos isolados de cães com IC induzida, identificaram maior susceptibilidade a lesões celulares induzidas por estresse oxidativo, quando comparados com seus controles.

Em resposta a várias condições de estresse como sobrecarga de pressão e de volume de enchimento, IM e diferentes tipos de cardiomiopatia, o coração entra num processo de adaptação aumentando de tamanho, um fenómeno chamado de hipertrofia. Já foi esclarecido que a transição da hipertrofia cardíaca ao estágio de IC envolve várias anormalidades que incluem desequilíbrio iônico, prejuízo na produção e utilização de energia, alteração no metabolismo do cálcio e defeitos nas proteínas contráteis e, mais recentemente, foram identificadas alterações na reserva antioxidante e produção de radicais livres na hipertrofia, assim como na IC. Os autores sugerem ainda, que a partir destes dados, novas estratégias de tratamento dietético com antioxidantes devam ser propostas (SINGAL et al., 1999; SINGAL et al., 2000; IDE et al., 2000).

1.7 – Alimentos Derivados da Soja

1.7.1 – Efeitos Benéficos do Consumo da Soja à Saúde

Nos últimos anos, várias pesquisas demonstraram os benefícios do consumo de produtos à base de soja para a promoção da saúde. Epidemiologistas da área da nutrição acreditam que a dieta consumida pelos asiáticos (consumidores de grandes quantidades de alimentos à base de soja) é a responsável pelos baixos índices de

doenças "ocidentais" como DCV, câncer de mama, de próstata e de cólon e Alzheimer e têm sugerido um papel protetor para as substâncias derivadas da soja (ADLERCREUTZ e MAZUR, 1995; CLARKSON et al., 1998).

Associados à proteína da soja encontram-se vários fitoquímicos, incluindo isoflavonas, fitatos, saponinas, fitoesteróis e inibidores de proteases. A soja e seus derivados são fontes abundantes de isoflavonas, às quais são atribuídos os benefícios à saúde (SETCHELL e CASSIDY, 1999; ARAI et al., 2000; REN et al., 2001; YAMAMOTO, et al., 2001; BROUNS, 2002; ZHANG et al., 2003).

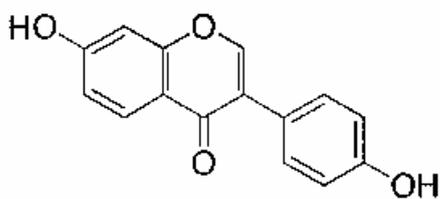
1.7.2 – Isoflavonas da Soja

As isoflavonas são uma subclasse de um grande grupo de nutracêuticos chamados flavonóides. As principais isoflavonas da soja são as formas agliconas (Figura 3): genisteína (4',5,7-triidroxi-isoflavona) e daidzeína (4',7-diidroxi-isoflavona). Os seus respectivos glicosídeos são: genistina, malonil-genistina, acetil-genistina, daidzina, malonil-daidzina e acetil-daidzina. Há também uma terceira isoflavona que está presente em quantidades menores, a gliciteína (7,4'-diidroxi-6-metóxi-isoflavona) e seus glicosídeos glicitina, malonil-glicitina e acetil-glicitina (HAVSTEEN, 2002). A quantidade de

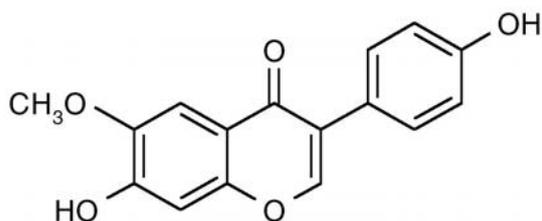
isoflavonas nos alimentos à base de soja varia muito e depende do produto, das técnicas de processamento usadas na sua produção, da variedade do grão, solo, clima e local (CASSIDY et al., 1995; MIKSICEK, 1995).



Genisteína



Daidzeína



Gliciteína

Figura 3. Estrutura química das isoflavonas agliconas encontradas na soja: gliciteína, genisteína e daidzeína.

A característica química comum das isoflavonas é a presença de um anel fenólico que lhes permite ligar-se aos receptores β de estrógenos, mas a atividade estrogênica é muito “fraca”, entre 1/500 e 1/100 da atividade do estrógeno 17β estradiol (JUVENIEWICZ et al., 1988; KUIPER et al., 1998).

As concentrações de isoflavonas (genisteína, daidzeína e gliciteína) variam de 2,0 – 2,4 mg/g de produto na proteína texturizada de soja, na farinha de soja e grânulos de soja enquanto que na proteína isolada de soja (PIS) variam de 0,62 – 0,99 mg/g. O queijo Tofu pode apresentar até 67mg/g de alimento (DWYER et al., 1994). Outros produtos à base de proteínas de soja apresentam concentrações de isoflavonas de até um grama por quilo em preparações desta proteína (SETCHEL et al., 1987; USDA, 2002). A quantidade média de proteína de soja ingerida nos Estados Unidos é menor de 5g por dia, enquanto que nos países orientais o consumo médio é 55g por dia (ZHANG, 2003; SETCHELL e CASSIDY, 1999; ADLERCREUTZ et al. 1993; NAGATA et al. 1998). Considerando o consumo de isoflavonas da soja, a ingestão de genisteína entre os ocidentais é de apenas 1 a 3 mg por dia e entre os asiáticos é de 20 a 80 mg por dia na dieta normal (BARNES et al., 1995; NAGATA et al., 1998).

Após a ingestão, as isoflavonas glicosídicas são hidrolisadas a suas formas agliconas pelas enzimas β -glicosidases (produzidas por vários grupos de bactérias intestinais incluindo lactobacilos e bifidobactérias) (XU et al., 1995). Antes da absorção das isoflavonas, as bactérias intestinais podem metabolizar as isoflavonas agliconas em seus metabólitos, especificamente, genisteína a *p*-etilfenol e daidzeína a equol e/ ou O-desmetilangolesina (O-DMA), que também são absorvidos (Figura 4). Após a absorção no intestino delgado, as isoflavonas são conjugadas, no fígado, com ácido glicurônico ou sulfato produzindo as formas medidas nos fluídos biológicos. Assim como os estrógenos endógenos, as isoflavonas são excretadas através da urina e da bile. Após a excreção biliar, entram na circulação êntero-hepática onde são desconjugadas no intestino e reabsorvidas ou excretadas nas fezes. As β -glicuronidases e sulfatases são necessárias para reabsorção após a excreção biliar (DAY et al., 1998; XU et al., 2000; SHELNUTT et al., 2002; ROWLAND et al., 2003).

As isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) são mais biodisponíveis do que as formas glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina), pois são absorvidas diretamente ou convertidas aos seus metabólitos, incluindo a conversão da daidzeína a equol e a genisteína a *p*-etilfenol. A absorção intestinal varia muito entre os

indivíduos e pode estar relacionada à ingestão de fibras, ao tipo de alimento (sólido ou líquido) e às condições da microflora intestinal. Após a absorção, as isoflavonas são reconjugadas a glicuronidas e excretadas sem modificação na urina (ADLERCREUTZ et al., 1987). Estudo realizado por Cassidy e colaboradores (2006) demonstrou que alimentos derivados de soja na forma líquida são mais rapidamente absorvidos do que os sólidos e apenas 30% dos indivíduos estudados conseguiu converter a daidzeína em equol.

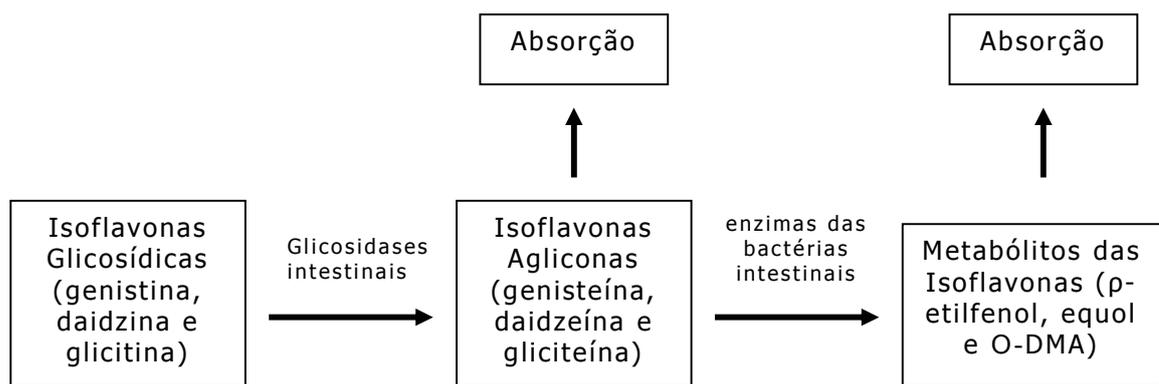


Figura 4 – Esquema de absorção e metabolismo das isoflavonas. O-DMA= O-desmetilangolesina. Adaptado de DUNCAN et al., 2003.

O processamento dos alimentos derivados de soja influencia a biodisponibilidade das isoflavonas. Hutchins e colaboradores (1995) verificaram que a excreção urinária foi semelhante em indivíduos que consumiram dois tipos de dieta à base de soja: grupo 1 - consumiu

dieta com soja fermentada = 112g de Tempeh (grãos de soja fermentados com o fungo *Rhizopus oligosporus*) e grupo 2 - consumiu dieta com soja não fermentada = 125g de soja fatiada. A diferença entre os grupos foi identificada pela maior reabsorção renal das isoflavonas no grupo que ingeriu Tempeh. Esses dados sugerem que, em alimentos fermentados, as isoflavonas são mais biodisponíveis.

As concentrações de isoflavonas urinárias e séricas aumentam de acordo com a quantidade consumida, indicando que a absorção ocorre de maneira dose-dependente (ADLERCREUTZ et al., 1995; KELLY et al., 1995; KARR, et al., 1997; SETCHELL, 1998; SETCHELL e CASSIDY, 1999; CASSIDY, 2006). Kirkman e colaboradores (1995) demonstraram que, após suplementação dietética de isoflavonas, os níveis plasmáticos e urinários aumentaram significativamente, pacientes que aumentaram sua ingestão de genisteína de 0,8 $\mu\text{mol}/\text{dia}$ para 23 $\mu\text{mol}/\text{dia}$ e de daidzeína de 0,3 $\mu\text{mol}/\text{dia}$ para 23 $\mu\text{mol}/\text{dia}$, após nove dias de consumo diário de 100g queijo tofu e 45g de proteína isolada de soja. A ingestão crônica de isoflavonas também afeta o seu metabolismo, por exemplo, após um mês de dieta com alto conteúdo de soja (36 Oz = 470 mL de leite de soja, contendo 100 mg de daidzeína e 115 mg de genisteína) mulheres jovens e saudáveis manifestaram aumento nas taxas de absorção,

mas também aumento da excreção urinária destes compostos (LU et al., 1996).

1.7.3 – Proteção Cardiovascular por Isoflavonas da Soja

Vários estudos demonstraram que o risco de mortalidade por DCV em mulheres é menor do que em homens. Após a menopausa, o risco de mortalidade por DCV aumenta nas mulheres, mas mesmo assim continua menor do que nos homens. Aos 60 anos de idade, as mulheres apresentam risco para DCV quase igual aos homens de 50 anos (STRAMBA-BADIALE et al., 2006). Alguns pesquisadores atribuem a proteção cardiovascular das mulheres à presença de estrógeno durante a idade fértil (O'BRIEN e NGUYEN, 1997).

Os mecanismos biológicos pelos quais os estrógenos endógenos e exógenos exercem seu efeito protetor são multifatoriais, afetando o metabolismo dos lipídios, dos glicídios, a distribuição da gordura corporal e a pressão sanguínea. A prevenção das doenças cardiovasculares com terapia de estrógenos tem o objetivo de corrigir tradicionais fatores de risco e controle direto da função e estrutura dos vasos (CASSIDY e GRIFFIN, 1999).

O Food and Drug Administration (FDA), órgão do governo americano que regulamenta a comercialização de medicamentos e

alimentos aprovou, em 1999, o apelo de saúde (“health claim”) para os produtos à base de soja. Pois diversas investigações científicas, testes clínicos e dados epidemiológicos indicaram que o consumo de soja (pelo menos 25g por dia) reduz o risco de DCV associado à ingestão de pequenas quantidades de gordura saturada (ADA, 1999).

Estudos epidemiológicos e experimentais vincularam a ingestão de dietas à base de proteína de soja e produtos alimentícios à base de soja com a redução de DCV (LICHTENSTEIN, 1998; ANTHONY et al., 1998; TIKKANEN e ADLERCREUTZ, 2000; ERDMAN, 2000; ZHAI, et al., 2001; SIRTORI e LOVATI, 2001; SCHREIBER et al., 2001; ZHANG et al., 2003).

Os efeitos benéficos da soja foram relacionados à melhora do perfil lipídico sangüíneo (POTTER et al., 1998; VITOLINS et al., 2001; MERZ-DEMLOW et al., 2000; ZHAN e HO, 2005;), à redução da LDL e dos triglicerídeos (WAGNER et al., 2000; ANDERSON et al., 1995; WANGEN et al., 2001; JENKINS et al., 2002; DEMONTY et al., 2002), ao aumento da resistência da LDL à oxidação (TIKKANEN et al., 1998; KERRY e ABBEY, 1998; WISEMAN et al., 2000; JENKINS et al., 2000), à melhora da reatividade vascular (NESTEL et al., 1997; WALKER, 2001; VAN DER SCHOUW, 2002) e à redução das concentrações de homocisteína (TONSTAD et al., 2002).

Foi também verificado que a genisteína inibe a formação de trombina e a ativação das plaquetas, reduzindo, desta forma, a formação de trombos (WILCOX e BLUMENTHAL, 1995; RAINES e ROSS, 1995).

Os resultados clínicos sobre o efeito do consumo de proteína de soja no perfil lipídico são variáveis e dependem dos níveis iniciais de colesterol sanguíneo. Uma meta-análise de 38 estudos clínicos concluiu que a média de redução do colesterol sanguíneo total foi de 9,3%, enquanto que o LDL diminuiu em média 12,9% com a ingestão de proteína de soja, 47 g por dia. A redução do LDL foi maior em pessoas com os mais altos níveis de colesterol sanguíneo (ANDERSON et al., 1995). Também foi observada uma redução de 9,6% no colesterol sanguíneo total em mulheres saudáveis, com níveis sanguíneos normais de colesterol, em idade fértil que consumiram 60g de proteína de soja por dia durante 1 mês (CASSIDY et al., 1995).

Estudos com macacos confirmaram os efeitos cardioprotetores da soja. A administração da dieta com proteína da soja resultou na melhoria significativa do perfil lipídico e diminuição da LPO em vasos arteriais (WAGNER et al., 1997; ANTHONY, 1997) quando comparada com dieta à base de caseína.

Um dos mecanismos propostos para o efeito de normalização da lipídemia pelos fitoestrógenos envolve a diminuição da secreção de β -apolipoproteína através de múltiplos mecanismos, incluindo o aumento da atividade dos receptores de LDL em humanos e animais e inibição da síntese e esterificação do colesterol (SIRTORI et al., 1995; WHITTEN e NAFTOLIN, 1998; BORRADAILE, 2002).

Vários estudos apontam para um papel antioxidante dos estrógenos. Os fitoestrógenos, por serem quimicamente semelhantes aos estrógenos, poderiam mimetizar seus efeitos *in vivo*, atuando no sistema de defesa contra os radicais livres (ARORA et al., 1998; CASSIDY e GRIFFIN, 1999).

Kapiotis e colaboradores (1997) observaram que as isoflavonas inibem a oxidação do LDL, constatado pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Os produtos da oxidação do LDL foram significativamente inibidos pela genisteína e daidzeína, mas não foram afetados pela genistina (forma glicosídica da genisteína) ou pelos controles. Além disso, a genisteína e a daidzeína demonstraram proteger contra os efeitos citotóxicos do LDL oxidado como avaliado pela morfologia celular e pela liberação da lactato desidrogenase em células endoteliais em cultura.

Foi demonstrado também que a genisteína tem efeito inibidor sobre a produção do peróxido de hidrogênio e aumenta

significativamente a atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a glutathione reductase. A genisteína e, em menor proporção, a daidzeína também podem inibir a geração do ânion superóxido pelo sistema xantina/xantina oxidase (WEI et al., 1995; RECORD, et al., 1995; GUO et al., 2002). A suplementação de genisteína diminuiu a LPO em fígado de hamster após 5 semanas de tratamento (FANG, 2004).

RuizLarrea e colaboradores (1997) demonstraram que a genisteína aumentou a resistência à oxidação do LDL colesterol *in vitro* e foi a isoflavona com maior poder antioxidante.

Os fitoestrógenos podem ter vantagens adicionais aos estrógenos convencionais, pois eles podem baixar o LDL colesterol sem induzir à hipertrigliceridemia (ANDERSON et al., 1995) e podem aliviar os sintomas da menopausa sem aumentar os riscos de neoplasia uterina e mamária (GOODMAN et al., 1996). As pesquisas científicas indicam que a terapia com fitoestrógenos, na forma de isoflavonas dietéticas, pode ser uma alternativa para mulheres na menopausa com risco de doença cardiovascular (LISSIN e COOKE, 2000).

Os mecanismos biológicos pelos quais estrógenos e fitoestrógenos podem conferir cardioproteção são multifatoriais, agindo nas lipoproteínas séricas, na homeostase, na função vascular

além de outras. Muitos dos efeitos cardioprotetores das isoflavonas devem-se à ação como antioxidante, desta forma, o uso dietético destes antioxidantes surge como uma estratégia alternativa para a prevenção da doença cardiovascular. Esta foi a principal proposta deste estudo.

2 – HIPÓTESE

A proteína isolada de soja (PIS) diminui o estresse oxidativo, limitando a disfunção ventricular após o infarto do miocárdio em ratos Wistar machos submetidos à ligadura da artéria coronária esquerda.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da Proteína Isolada de Soja (PIS) e do Gérmen de Soja (GS), assim como o efeito da dieta à base de PIS sobre o estresse oxidativo cardíaco e sistêmico em ratos submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio.

3.2 - Objetivos Específicos

3.2.1 - Analisar o conteúdo de isoflavonas da PIS e do GS;

3.2.2 – Avaliar, *in vitro*, a capacidade e a reatividade antioxidante do GS e da PIS e a capacidade de inibição da lipoperoxidação destes produtos;

3.2.3 - Avaliar parâmetros nutricionais, morfométricos e hemodinâmicos após a administração da dieta à base de PIS em ratos submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio;

3.2.4 - Medir o estresse oxidativo sistêmico através da concentração de lipídios oxidados, da atividade das enzimas antioxidantes e de nitritos/nitratos;

3.2.5 – Analisar o estresse oxidativo do músculo cardíaco através da oxidação de lipídios e proteínas e através da atividade das enzimas antioxidantes.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Análise do Conteúdo de Isoflavonas no GS e na PIS

As isoflavonas foram extraídas de 100 mg de cada produto, GS e PIS. As amostras foram colocadas em tubos contendo 4,0 mL de etanol hidratado a 70% e 0,1% de ácido acético, à temperatura ambiente por 5 horas, os tubos foram agitados a cada 15 minutos. Após, 1,5 mL do extrato foi transferido para tubos "Eppendorff" e estocados em freezer para a análise por HPLC. Para análise por HPLC, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.500 rpm, à temperatura de 10°C, numa centrífuga "Eppendorff" modelo 5417R. Após a centrifugação, 80 µL de sobrenadante foram transferidos aos microtubos do HPLC. O volume injetado foi de 10 µL. A análise de isoflavonas foi realizada na coluna ODS C-18 (YMC-Pack ODS-AM), com tamanho de partícula de 5 microns, 120 A (250 x 4.6 mm I.D.) com uma coluna de segurança Metaguard. O solvente A foi a solução de acetonitrila e 0,1% ácido acético, enquanto que o solvente B foi a solução de água e 0,1% ácido acético. O gradiente inicial foi de 20% para o solvente A e 80% para o solvente B. A completa eluição de cada amostra foi realizada em 40 minutos. O comprimento de onda usado foi 260 nm. Os picos de isoflavonas foram identificados por

seu espectro e tempo de retenção. As curvas-padrão foram preparadas com padrões de isoflavonas puras (0,0125 mg/mL) de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína (Marca SIGMA) e o coeficiente de extinção molar obtido dessa curvas foi usado para determinar os níveis de todas as formas de isoflavonas no GS e PIS usadas neste estudo (BERHOW, 2000). A proteína foi medida pelo método de Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) (Anexo 1). Essas análises foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (Anexo 2).

4.2 – Experimentos *in vitro*

4.2.1 – Análise da Reatividade e da Capacidade Antioxidante Total em GS e PIS

As amostras de GS e de PIS foram dissolvidas em DMSO 10% para atingir a concentração final de 2, 0% (P/V) do produto no meio de incubação das técnicas de reatividade antioxidante total e de capacidade antioxidante total.

4.2.1.1 - Reatividade Antioxidante Total (TAR)

A medida de TAR é baseada na formação de radicais que emitem luz e que é detectado em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio, como descrito por Lissi e colaboradores em 1992. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. A mistura da reação continha 2mmol/L de 2'- azo-bis (2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) e 6 mmol/L luminol em tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. Os valores de TAR foram determinados pela avaliação da queda inicial da luminescência que foi calculada como a razão de quimiluminescência (QL) na ausência de aditivos e a QL após a adição de 20 nmol/L Trolox (vitamina E hidrossolúvel) ou amostra (10 μ L) de GS ou PIS dissolvidos em DMSO 10%. Os valores de TAR foram expressos como pmoles de equivalentes de Trolox por miligrama de proteína.

4.2.1.2 - Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

A técnica baseada em Lissi e colaboradores 1992 representa a capacidade antioxidante total e foi determinada pela medida da intensidade da QL induzida pelo ABAP, utilizando o contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. Os experimentos foram realizados em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente.

Esta técnica é dependente da temperatura. Em baixas temperaturas a reação é muito mais lenta, porque é baseada na decomposição do ABAP que gera radicais livres. Esta substância tem uma ligação dupla entre dois nitrogênios, bastante instável e que, com o aumento da temperatura, há termólise, gerando dois radicais livres.

Estes radicais livres por sua vez reagirão com o luminol para gerar um outro radical livre mais energético e com maior emissão de luz e, assim, mais facilmente detectada pelo contador. No entanto, se estiver presente no meio da reação um antioxidante, ele irá neutralizar os radicais livres e assim diminuir a emissão de luz. Como padrão utiliza-se o antioxidante Trolox (vitamina E hidrossolúvel) que

forma um radical estável. Quando todo o antioxidante tiver reagido, o luminol reage novamente com o ABAP e há um aumento na emissão de luz. Esta análise foi feita utilizando-se os seguintes reagentes:

Foram adicionados 4 mL de ABAP (10 mmol/L) ao frasco do experimento para medida da QL basal.

Para fazer a curva padrão, foram feitas duas leituras utilizando-se Trolox nas quantidades de 5 μ L e 10 μ L (0,2 μ mol/L em tampão glicina 0,1 mol/L com pH 8,6). Os resultados foram expressos em mmol/L de Trolox.

Após a medida da QL basal, foram acrescentados 10 μ L de amostra de GS ou PIS (dissolvidos em DMSO 10%) e a QL foi medida até atingir os valores iniciais. A adição de Trolox ou produto de soja no meio de incubação reduz a QL. O tempo necessário para retornar aos valores apresentados antes da adição do Trolox ou produto de soja, foi considerado o Tempo de Indução (TI). O TI é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do produto de soja e foi comparado ao TI do Trolox. Os resultados foram apresentados em nmol/L Trolox/mg proteína. (EVELSON et al., 2001).

4.2.2 - Preparo do Homogeneizado de Fígado de Ratos e dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS).

Homogeneizado de fígado de ratos machos Wistar (n=6) (1/10 = P/V) com 3 meses de idade, alimentados com ração padrão do biotério, foram incubados a 37 °C por 15 min. na presença de GS e PIS. A concentração final de cada produto foi de 2,0%. Os controles foram incubados com tampão fosfato de potássio 10 mmol/L, pH 7,6. Após a incubação, foi acrescentado o sistema gerador de radicais livres cujas concentrações finais foram: 0,5 mmol/L de peróxido de hidrogênio 30% – Sigma, 1,0 mmol/L de ácido ascórbico e 0,02mmol/L de cloreto ferroso (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990) e foram incubados a 37 °C por 30 min. Após a incubação, foram retirados 0,25 mL de amostra para dosagem de lipoperoxidação pela técnica de medida das TBA-RS.

A técnica de TBA-RS é bastante utilizada para medir a LPO, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, dentre os quais está o malondialdeído e outros aldeídos.

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico em meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base

de Schiff). Para que ocorresse a reação, foram adicionados em 0,25mL de amostra (preparação da amostra conforme descrito acima no item 4.2.2) 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (P/V) (que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação) e 0,75 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V) (que reage com os produtos da LPO formando um composto de coloração rosada) e incubados por 15 minutos a 100 °C e, em seguida, resfriados no gelo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em absorvância de 535nm.

Os resultados foram expressos em μ moles de malondialdeído por mg de proteína a partir da curva padrão com tetrametoxipropano (BUEGE e AUST, 1978).

4.3 – Experimentos *in vivo* e *ex vivo*

Foram utilizados ratos machos Wistar provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Os animais receberam a dieta a partir da 3ª semana de vida e, quando completaram 12 semanas de vida, foram analisados os parâmetros hemodinâmicos e, após, os animais foram sacrificados e coletados sangue, coração, gordura corporal, fígado e pulmões. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas de 270 x 260 x 310 (1 animal

por gaiola) (Figura 5). Eles receberam água e dieta isocalórica, contendo PIS ou caseína (17% de proteína) *ad libitum*, a partir da 3ª semana até a 12ª semana de vida. Foram mantidos à temperatura entre 22 e 25 °C com ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro.



Figura 5 - Gaiola metabólica e gaioleiro ao fundo

4.3.1 - Composição da Dieta

A formulação da dieta foi baseada no padrão de dieta do American Institute of Nutrition Rodent Diets - AIN-93 (Reeves et al., 1993), isocalórica (369Kcal/ 100g de ração) e isoproteica. Todas as dietas foram preparadas no nosso laboratório e cada lote foi estocado

a 4° C pelo prazo máximo de 3 semanas, conforme recomendação do AIN-93. A Tabela 1 especifica a quantidade em gramas de cada ingrediente/ nutriente por quilo de ração das rações controle (caseína) e experimental (PIS).

Tabela 1 – Composição da Dieta Controle e Experimental por quilo de ração.

| Ingredientes | Caseína (g/kg) | PIS (g/kg) |
|----------------------------------|----------------|------------|
| Caseína (86,7% proteína)* | 211 | – |
| PIS (92% proteína)* | – | 206 |
| Amido de Milho | 520 | 525 |
| Sacarose | 100 | 100 |
| Óleo de Soja | 70 | 70 |
| Fibras | 50 | 50 |
| Mistura de Minerais (AIN-93G-MX) | 35 | 35 |
| Mistura de Vitaminas (AIN-93-VX) | 10 | 10 |
| L-Metionina | 1,5 | 1,5 |
| Bitartarato de Colina | 2,5 | 2,5 |
| Tert-Butilhidroquinona (TBHQ) | 0,014 | 0,014 |

*Conteúdo de proteínas avaliado pelo Laboratório de Físico Química da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Paraná, Brasil (Anexo 1).

A PIS utilizada para o preparo da ração experimental é uma proteína isolada denominada Samprosoy 90LH, fabricada pela SOLAE COMPANY – Esteio - RGS. É de alta qualidade protéica, desenvolvida para ser usada como ingrediente na fabricação de diversos produtos alimentares como bebidas, embutidos, alimentos infantis, biscoitos, entre outros.

A qualidade nutricional das proteínas está vinculada à sua composição de aminoácidos, digestibilidade e capacidade de fornecer aminoácidos essenciais nas quantidades requeridas pela espécie que a consome. O método adotado pela Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA) para a avaliação da qualidade protéica e rotulação nutricional para produtos destinados a crianças acima de dois anos de idade e adultos é denominado Pontuação de Aminoácidos Corrigida pela Digestibilidade de Proteínas *ou protein digestibility – corrected amino acid score* (PDCAAS) (SIZER e WHITNEY, 2003).

O PDCAAS é um método de pontuação de aminoácidos que compara o perfil de aminoácidos do alimento protéico de teste ao padrão de aminoácidos de crianças com dois a cinco anos de idade da FAO/WHO, 1991. Esse padrão é usado porque ultrapassa os padrões de necessidade de aminoácidos de crianças com idade acima de dois anos e adultos. O aminoácido mais limitante é usado para determinar

a pontuação de aminoácidos não corrigida, e esse número multiplicado pela digestibilidade do alimento é o PDCAAS.

“Com esse método, as proteínas isoladas de soja da marca Solae têm a mais alta pontuação que se pode obter (1,0) para o cálculo do valor protéico corrigido. Nenhuma proteína pode ter um PDCAAS maior que 1,0. O PDCAAS calculado para o Samprosoy 90LH foi de 97% - Pontuação de Aminoácidos Não Corrigida = 26 dividido por 25 = 1,04 Pontuação de Aminoácidos Corrigida pela Digestibilidade de Proteínas = 0,972 x 1,04 = 1,00” (SOLAE COMPANY).

Tabela 2 - Comparação entre o conteúdo de aminoácidos do Samprosoy 90LH e o padrão de referência para aminoácidos essenciais da FAO/WHO, 1985.

| Aminoácidos essenciais | *Samprosoy 90LH mg/g de proteínas | **Padrão de 2 a 5 anos da FAO/WHO mg/g de proteínas |
|-------------------------|--------------------------------------|--|
| Histidina | 26 | 19 |
| Isoleucina | 49 | 28 |
| Leucina | 82 | 66 |
| Lisina | 63 | 58 |
| Metionina + Cistina | 26 | 25 |
| Fenilalanina + Tirosina | 90 | 63 |
| Treonina | 38 | 34 |
| Triptofano | 13 | 11 |
| Valina | 50 | 35 |

* Proteínas da soja, Solae Company

** Adaptado da FAO/WHO, 1985.

4.4 - Grupos Experimentais

Os ratos machos Wistar foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

Caseína Controle (CC): Este grupo recebeu ração controle à base de caseína e água *ad libitum* e foi submetido à cirurgia fictícia de infarto do miocárdio.

Caseína Infarto<25% (CI<25%): Este grupo recebeu ração controle à base de caseína e água *ad libitum* e foi submetido ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto inferior a 25%.

Caseína Infarto>25% (CI>25%): Este grupo recebeu ração controle à base de caseína e água *ad libitum* e foi submetido ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto superior a 25%.

Soja Controle (SC): Este grupo recebeu dieta experimental à base de PIS e água *ad libitum* e foi submetido à cirurgia fictícia de infarto do miocárdio.

Soja Infarto<25% (SI<25%): Este grupo recebeu dieta experimental à base de PIS e água *ad libitum* e foi submetido ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto inferior a 25%.

Soja Infarto>25% (SI>25%): Este grupo recebeu dieta experimental à base de PIS e água *ad libitum* e foi submetido ao modelo animal de infarto do miocárdio, com área de infarto superior a 25%.

4.5 – Protocolo Experimental

- 1) O tratamento dietético iniciou na terceira semana de vida dos animais, após o desmame;
- 2) O infarto ou a cirurgia fictícia de infarto do miocárdio foi realizada na 8ª semana de vida;
- 3) As medidas hemodinâmicas e o sacrifício dos animais ocorreram na 12ª semana de vida. Os animais foram instrumentados com catéter sob anestesia, na artéria carótida, para medida direta das pressões intraventriculares esquerdas e aórticas. Foram coletadas amostras de sangue para a realização das medidas de concentração plasmática de nitritos e nitratos, e em eritrócitos foram feitas medidas de lipoperoxidação e de enzimas antioxidantes.
- 4) Após, os animais foram sacrificados por decapitação, seus corações foram retirados, pesados e determinada a área de infarto dos ratos submetidos à ligadura da artéria coronária esquerda. Os corações foram homogeneizados para realizar as medidas bioquímicas (enzimas antioxidantes, quimiluminescência e carbonilas). O fígado, os pulmões e o tecido adiposo abdominal (gordura perirrenal, epididimal e mesentérica) e tecido adiposo marrom (da região interescapular) foram dissecados e pesados e o nível de congestão

hepática e pulmonar determinado. O quadro 1 resume a seqüência do protocolo experimental.

Tabela 3 – Protocolo experimental do estudo *in vivo* dos animais a partir da 3^a semana de vida até a 12^a semana de vida.

| Grupos de Animais | 3 ^a semana de vida dos animais | 8 ^a semana de vida dos animais | 12 ^a semana de vida dos animais |
|--------------------------|---|--|--|
| Caseína Controle (CC) | Início da dieta à base de caseína | Cirurgia Fictícia de infarto | Sacrifício |
| Caseína Infarto (CI<25%) | Início da dieta à base de caseína | Cirurgia de Infarto, com área de infarto inferior a 25% | Sacrifício |
| Caseína Infarto (CI>25%) | Início da dieta à base de caseína | Cirurgia de Infarto, com área de infarto superior a 25% | Sacrifício |
| Soja Controle (SC) | Início da dieta à base de PIS | Cirurgia Fictícia de infarto | Sacrifício |
| Soja Infarto (SI<25%) | Início da dieta à base de PIS | Cirurgia de Infarto, com área de infarto inferior a 25% | Sacrifício |
| Soja Infarto (SI>25%) | Início da dieta à base de PIS | Cirurgia de Infarto, com área de infarto superior a 25%. | Sacrifício |

4.6 – Avaliação Nutricional

O consumo alimentar foi avaliado três vezes por semana desde o início do tratamento pelo monitoramento da ração oferecida, subtraindo os restos deixados pelos animais. Os animais foram pesados semanalmente, sempre no mesmo dia e horário para avaliação de crescimento.

Após a decapitação, os ratos foram pesados e medidos para a determinação do Índice de Lee, fórmula utilizada para avaliar o estado nutricional de ratos (BERNARDIS e PATTERSON, 1968). Consiste em dividir a raiz cúbica do peso corporal pelo comprimento naso-anal, é considerado normal o resultado em torno de 0,300.

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso corporal(g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (cm)}} \times 100$$

O tecido adiposo abdominal (gordura perirrenal, epididimal e mesentérica) e marrom (da região interescapular) foram dissecados e pesados.

4.7 – Indução ao Infarto do Miocárdio

Após cinco semanas do início do tratamento dietético, foi realizada a cirurgia de indução do infarto através da oclusão da

artéria coronária descendente esquerda. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ligadura da artéria coronária descendente esquerda ou à cirurgia fictícia (sham), em que todos os procedimentos cirúrgicos são efetuados, exceto a sutura da artéria, que não foi realizada. Os animais foram anestesiados com éter, colocados em decúbito dorsal, realizada tricotomia da região torácica, uma pequena incisão foi realizada na pele e os músculos peitorais foram afastados. Foi realizada uma toracotomia esquerda em nível do quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as costelas para permitir a melhor visualização. O pericárdio foi seccionado, o átrio esquerdo afastado para visualização da artéria coronária descendente esquerda que foi ligada com um fio mononylon 6,0 (Ethicon, Brasil) (Figura 6), que provocou a isquemia miocárdica. Após a ligadura da coronária, a incisão torácica foi fechada utilizando-se fio mononylon 5,0. Logo após, o animal foi reanimado e estimulado à respiração. Os animais foram colocados em ambiente aquecido para recuperação (PFEFFER et al., 1979; MILL et al., 1990).

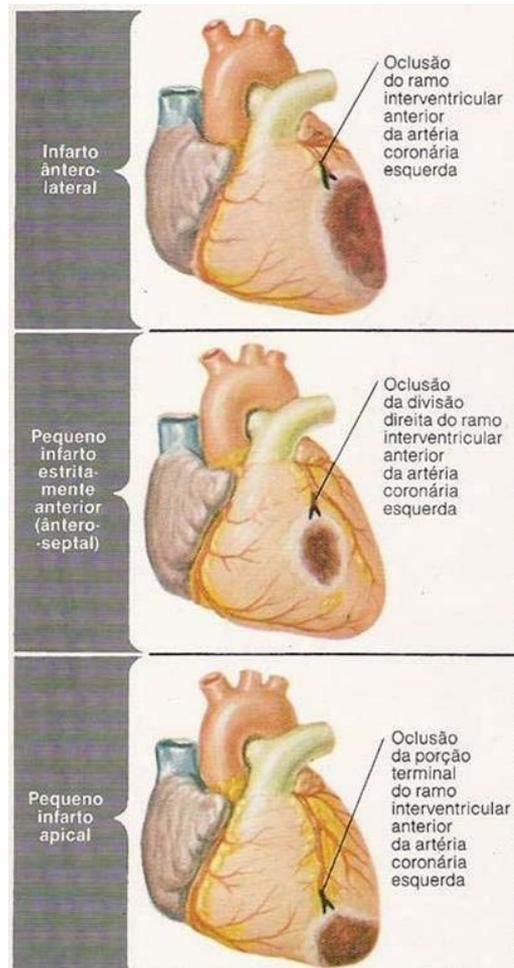


Figura 6 – Ilustração do procedimento cirúrgico de ligadura da artéria coronária esquerda – oclusão da circulação coronariana no ventrículo esquerdo.

4.8 - Avaliações Hemodinâmicas

4.8.1 - Registro das Pressões Ventriculares Esquerdas e Aórticas

Na quarta semana após a cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda ou cirurgia fictícia, os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de quetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal. Foi utilizado, para a canulação do ventrículo esquerdo via artéria carótida direita, um catéter de polietileno (PE50) conectado a um transdutor de pressão (Strain-Gauge-Narco Biosystem Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) e acoplado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). O catéter foi inserido até o ventrículo e sua posição foi determinada pela observação da onda característica de pressão ventricular. Após 5 minutos de estabilização, foram registradas a pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) e a pressão aórtica média (PAM) (Figura 7). Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (CODAS - Data Acquisition System, PC 486) com taxa de amostragem de 2000 Hz (LI et al., 2000).

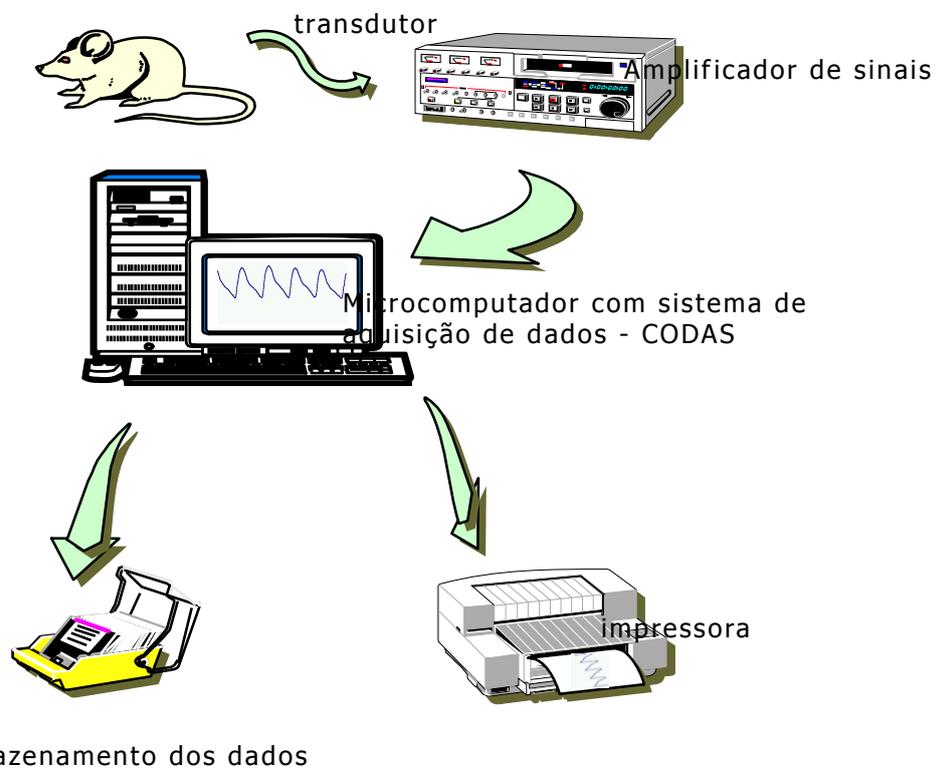


Figura 7 – Sistema de aquisição de dados de pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) e pressão aórtica média (PAM).

4.8.2 – Análise da Pressão Ventricular Esquerda

A PSVE foi determinada utilizando-se um programa comercial (CODAS-Data Acquisition System, PC 486) associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a detecção dos valores máximos e

mínimos da curva de pressão, batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão ventricular.

A PDFVE foi determinada pela detecção manual do ponto de inflexão no traçado da onda de pressão diastólica do ventrículo esquerdo. Foram realizadas 20 detecções por registro.

4.8.3 – Análise dos Índices de Relaxamento e de Contratilidade Ventricular

A análise foi realizada utilizando-se um programa comercial (CODAS-Data Acquisition System, PC 486) associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a derivação da onda de pressão ventricular esquerda e detecção dos valores máximos e mínimos destas curvas, batimento a batimento, fornecendo os valores das derivadas positiva ($+dP/dt$ - índice de contratilidade) e negativa ($-dP/dt$ - índice de relaxamento), expressas em mmHg/s.

4.9 - Coleta de sangue

Após a análise hemodinâmica, foi feita a coleta de sangue dos animais, através da cânula arterial, para realizar as medidas de nitritos e nitratos plasmáticos e de estresse oxidativo em eritrócitos

através das medidas de QL e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), em ratos nos distintos grupos experimentais.

4.10 – Índice de Hipertrofia Cardíaca

Os animais anestesiados foram sacrificados por meio de decapitação. O coração foi retirado, os átrios separados dos ventrículos e desprezados. Os ventrículos foram pesados em conjunto e o índice de hipertrofia cardíaca (mg/g) foi estabelecido por meio da seguinte fórmula (PFEFFER et al., 1979):

$$\text{Hipertrofia cardíaca} = \frac{\text{peso dos ventrículos} \times 1000}{\text{peso corporal}}$$

4.11 - Análise da Área de Infarto

Para determinação do tamanho do infarto, a cicatriz da parede ventricular foi cuidadosamente separada do restante do ventrículo esquerdo. As áreas infartada e não-infartada do ventrículo esquerdo (VE), assim como a área do ventrículo direito (VD) foram pesadas e desenhadas em papel milimetrado. O papel foi recortado e pesado. A área de infarto foi calculada utilizando os valores do peso do papel milimetrado na seguinte fórmula (MILL et al., 1990):

$$\text{Área de infarto} = \frac{\text{massa da região infartada}}{\text{massa do VE} + \text{massa do VD}} \times 100\%$$

Nos corações dos animais dos grupos sham (sem infarto) e infartados foram realizados cortes histológicos para verificar a deposição ou não de colágeno. As lâminas foram coradas com tricrômico verde.

4. 12 - Preparação do Homogeneizado de Tecido Cardíaco

Cada rato foi pesado (balança Marte) e sacrificado por decapitação, com auxílio da guilhotina. O tórax e abdômen foram abertos e rapidamente removidos o coração, pulmões, fígado, tecido adiposo abdominal e tecido adiposo marrom interescapular. O coração foi lavado por três vezes em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15% (P/V), seco, retirados os átrios e o excesso de gordura. Para cada grama de tecido cardíaco foram acrescentados 5 mL de KCl e foram acrescentados 10 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) para cada 1 mL do homogeneizado, sendo homogeneizado em Ultra-Turrax por 40 segundos e centrifugado em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24) por 10 minutos (0 - 4 °C) (LLESUY et al, 1985).

4. 13 - Nível de Congestão Hepática e Pulmonar

Após a morte dos animais, o fígado e os pulmões foram extraídos e pesados, determinando-se o peso úmido destes órgãos. O nível de congestão hepática e pulmonar foi avaliado a partir da razão do peso úmido/peso corporal e expresso em mg/g (KOMPA e SUMMERS, 2000).

4.14 – Avaliações Bioquímicas

Foram realizadas avaliações bioquímicas nas seguintes amostras:

Em músculo cardíaco: QL, carbonilas e atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx)..

Em eritrócitos: QI e atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx).

Em plasma: nitritos e nitratos.

4.14.1 - Quimiluminescência (QL) iniciada por tBOOH

O método consiste na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética à amostra para avaliação da capacidade de resposta produzida pela mesma. A realização deste tipo de teste consiste no

fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, com frascos de vidro mantidos na penumbra, a fim de evitar a ativação da fosforescência pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5 mL de uma solução reguladora (KCl 140 mmol/L e fosfatos 20 mmol/L) em pH 7,4, na qual foi adicionado 0,5mL de homogeneizado de tecido cardíaco. Já para a amostra de sangue, utilizou-se 4 mL do mesmo tampão e 10 μ L do preparado de eritrócitos lavados. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerando a emissão de luz basal pelo homogeneizado ou eritrócitos. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de tert-butil 400mmol/L, sendo adicionados 30 μ L no meio de reação, para uma concentração final de 3 mmol/L. Foi medida a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por mg de proteína, para o homogeneizado, e cps por mg de hemoglobina, para as amostras de sangue (GONZALEZ FLECHA et al., 1991).

4.14.2 - Dosagem de Carbonilas

O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (REZNICK e PACKER, 1994). A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sangüíneo com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorbância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes:

- ⇒ guanidina (6 mol/L) em HCl (2,5 mol/L) pH= 2,5
- ⇒ 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em HCl (2,5 mol/L)
- ⇒ TCA 20% (P/V)
- ⇒ TCA 10% (P/V)
- ⇒ etanol - acetato de etila 1:1 (V/V)

Paralelamente, foi realizada a curva padrão de proteína, com albumina, com a absorbância lida em 280nm no espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína.

4.14.3 - Dosagem da Atividade das Enzimas Antioxidantes

4.14.3.1 – Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio. A técnica utilizada neste estudo, para medir sua atividade, baseia-se na capacidade de inibição da autooxidação do pirogalol pela SOD. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a autooxidação do pirogalol. Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50 mmol/L; EDTA a 1mmol/L, e HCl para atingir o pH 8,2), pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mmol/L) e catalase a 30 μ mol/L. Para que os valores de inibição, dados em percentagem, fossem transformados em unidade de SOD, necessitou-se de um fator de calibração. Por isso, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de SOD comercialmente disponível. Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da auto-oxidação em unidades de enzima. No ensaio, adicionou-se à cubeta 988 μ L de tampão Tris-base, 4 μ L de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro a 420nm e adicionou-se 8 μ L de pirogalol, observando-se a autooxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância,

para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD da amostra. Com a amostra, procedeu-se da mesma forma, apenas com o ajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de amostra adicionada, para se ter um volume final de 1 mL (MARKLUND, 1985).

4.14.3.2 - Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, obedecendo a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, a atividade da catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. O método consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240 nm, sendo este o comprimento de onda onde há maior absorção do peróxido de hidrogênio. Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes:

- ⇒ Solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L (pH 7,4);
- ⇒ peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L.

Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e 10 μ L de amostra do homogeneizado de tecido ou 30 μ L de

amostra de eritrócitos, a cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Feito isso, foram adicionados 35 μ L do peróxido de hidrogênio para o tecido e 15 μ L para amostra de sangue e se observou a diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (AEBI, 1984).

4.14.3.3 - Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH), formando glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. A sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de regeneração de GSH a partir de GSSG. A amostra foi previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidativa da hemoglobina, transformando-a em cianometahemoglobina. Desta forma, a atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary. Foi observada diminuição de absorbância do NADPH a 340nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes:

⇒ Solução tampão de fosfatos 140mmol/L e EDTA 1mmol, com pH = 7,5;

- ⇒ NADPH 0,24 mmol/L;
- ⇒ Azida sódica 1 mmol/L, utilizada para inibir a atividade da catalase;
- ⇒ GSH 5 mmol/L;
- ⇒ Glutathione redutase (GR) 0,25 U/mL;
- ⇒ Hidroperóxido de tert-butil 0,5 mmol/L.

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 μ L de tampão, 50 μ L de amostra (homogeneizado de tecido ou sangue), 500 μ L de NADPH, 10 μ L de azida sódica, 50 μ L de GSH e 10 μ L de GR. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos, até ocorrer certa estabilização da linha base. Depois, foram adicionados 50 μ L de hidroperóxido de tert-butil e observou-se a diminuição da absorbância devido ao consumo de NADPH, por aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

4.14.4 - Análise de Nitritos e Nitratos

Os níveis de nitratos e nitritos no plasma foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess. Alíquotas de 50 μ L foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por trinta minutos em temperatura ambiente, para conversão do nitrato.

O nitrito formado foi, então, analisado pela reação deste com o reagente de Griess. Formou-se um composto corado que foi medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e expresso em $\mu\text{mol/L}$. A quantificação dos níveis de nitratos foi feita utilizando-se os seguintes reagentes: Reativo de Griess (1 g de sulfanilamina, 0,1 g de naftiletlenodiamina, 2,3 mL de ácido ortofosfórico 85%, 97,7 mL de água); Tris 1 mol/L, pH 7,5; NADPH 0,02 mmol/L; glicose 6-fosfato (G6P) 5 mmol/L; glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10 U/mL e nitrato redutase 0,1 U/mL. No meio de reação foram adicionados 50 μL de amostra, 10 μL de NADPH, 7 μL de Tris, 23 μL de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 μL de nitrato redutase. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Após, foi adicionado 100 μL do reagente de Griess, que foi incubado, novamente, à temperatura ambiente sob agitação por mais 10 min e a absorbância foi lida a 540nm. Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão, utilizando-se nitrato de sódio 1 mmol/L e expressos em $\mu\text{mol/L}$ (GRANGER et al., 1999).

4.15 - Método de Lowry

Para quantificar a proteína dos tecidos foi utilizado o método de Lowry et al., 1951. Em tubos de ensaio pequenos foram colocados:

T1, T2 e T3 que correspondem a curva de calibração da albumina (proteína bovina), tubos para as amostras e para o branco.

Em cada tubo foram colocados 800 μL de água, 20 μL de amostra e para a curva de calibração foram colocados em T1 50 μL , T2 100 μL e em T3 150 μL , após foram adicionados 2 ml do reativo C e esperou-se dez minutos para acrescentar 200 μL de Folin (reagente diluído a 1/3). Esperou-se trinta minutos para fazer a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm. A concentração de proteínas foi expressa em mg/mL.

4.16 - Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm D.P.M. (desvio padrão da média) para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados.

Para a comparação entre os grupos, foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, complementada com o teste de Student-Newmann-Keuls. Para as análises de correlação foi aplicado o teste de Pearson. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Para análise da mortalidade dos animais pós-IM foi aplicado o teste

do Qui-quadrado e para avaliar a sobrevivência dos animais nos dois grupos foi aplicado o teste log-rank.

Na análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad InStat, versão 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

5 - RESULTADOS

5.1 – Resultados dos experimentos *in vitro*

5.1.1 – Conteúdo de Isoflavonas no GS e na PIS

A tabela 3 mostra o conteúdo de isoflavonas no GS e na PIS, de acordo com a análise realizada na EMBRAPA (Anexo 2). O GS apresentou maiores quantidades de isoflavonas totais e também de daidzina (9 vezes mais), genistina e malonil-daidzina do que a PIS. No entanto, a PIS apresentou quantidades superiores de genisteína (4,5 vezes mais) e malonil-genistina (4,5 vezes mais) comparada ao GS.

A quantidade total de isoflavonas da PIS é 189mg por 100g de produto, este valor corresponde a 126mg por 100g de produto em equivalentes de agliconas (calculado pelos pesquisadores da Solae Company, demonstrado no Anexo 3).

Tabela 4 - Conteúdo de isoflavonas (mg/ 100g de produto) em GS e PIS.

| Isoflavonas | Produto | |
|-------------------|--|------|
| | Conteúdo de Isoflavonas (mg/ 100g product) | |
| | GS | PIS |
| Daidzeína | 21,8 | 24,4 |
| Genisteína | 5,2 | 23,2 |
| Daidzina | 186,5 | 19,7 |
| Genistina | 63,2 | 34,1 |
| Malonil-Daidzina | 52,7 | 21,4 |
| Malonil-Genistina | 14,6 | 66,2 |
| TOTAL | 344 | 189 |

GS – Gérmen de Soja. PIS – Proteína Isolada de Soja.

Análise realizada no Laboratório de Físico-Química da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Paraná, Brasil. (Anexo 2).

5.1.2 – Reatividade Antioxidante Total (TAR) e Capacidade Antioxidante Total (TRAP) do GS e da PIS

As técnicas de TAR e TRAP foram realizadas, *in vitro*, utilizando GS e PIS, na concentração final de 2% (P/V). Comparando os resultados de TAR dos dois produtos, observamos que o GS tem quase 3 vezes mais reatividade antioxidante do que a PIS. No entanto, a quantidade total de antioxidantes foi semelhante nos dois produtos (Figura 8).

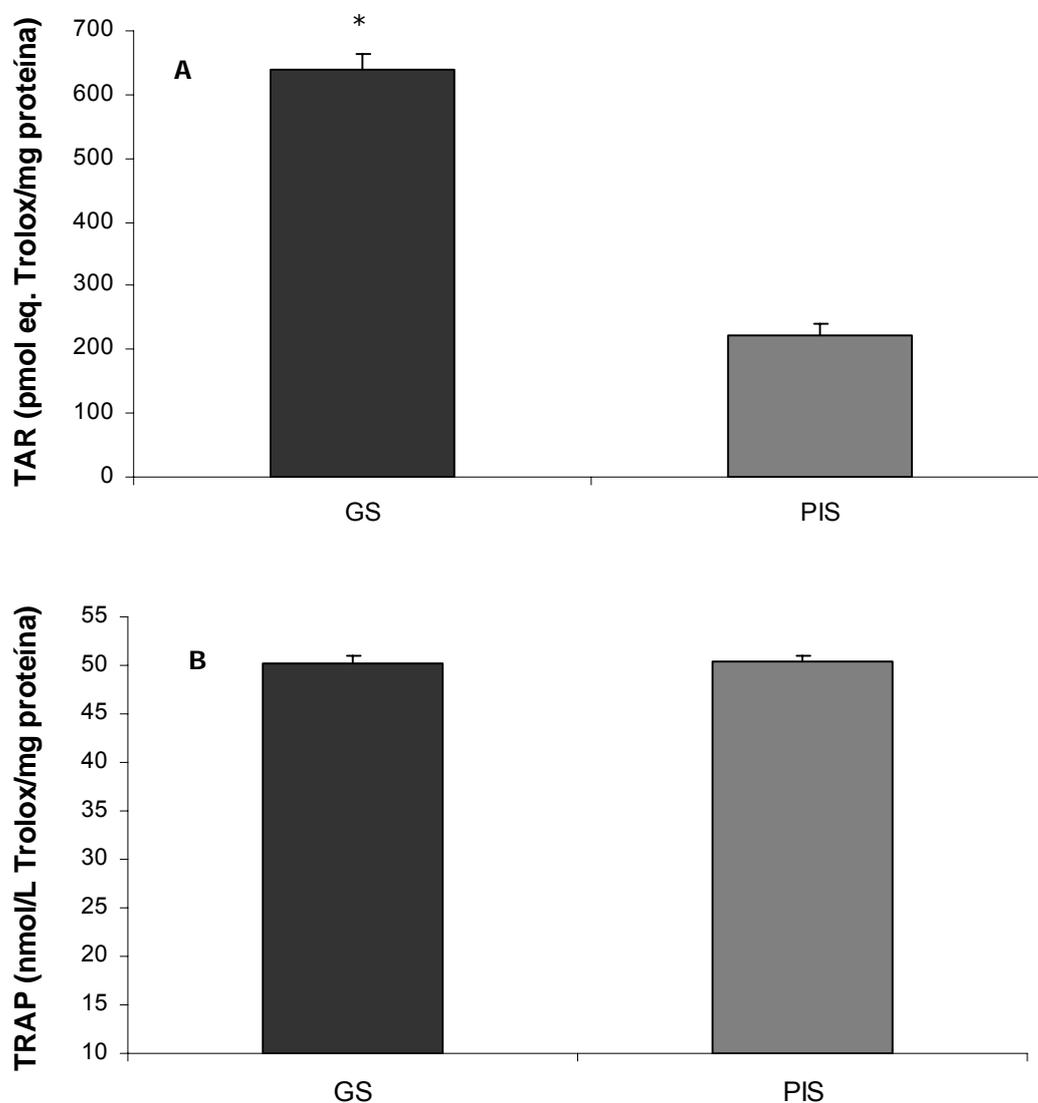


Figura 8. **A** – Reatividade Antioxidante Total (TAR) do Gérmen de Soja (GS) e da Proteína Isolada de Soja (PIS). Resultados expressos em média \pm D.P. (triplicata). O TAR é representado em pmoles de equivalentes de Trolox por mg proteína. * $p < 0,01$. **B** – Capacidade Antioxidante Total (TRAP). Resultados expressos em média \pm D.P. (triplicata). O TRAP é representado como nmol/L de Trolox por mg proteína.

5.1.3 – Percentual de Inibição de TBA-RS em Homogeneizado de Fígado de Ratos Incubados com GS e PIS

Foi feito um sistema gerador de radicais livres, que induziu à reação de Fenton em homogeneizado de fígado de ratos *in vitro*. A fim de verificar o efeito do GS e da PIS sobre a LPO formada neste experimento, adicionou-se os produtos de soja nas concentrações finais de 2%. A inibição da LPO foi quantificada pelo método de TBA-RS (Figura 9). O resultado do grupo controle (homogeneizado de fígado de ratos incubado com tampão fosfato de potássio 10 mmol/L, pH 7,6) foi de 5,95 μ moles MDA/mg proteína. Os dois produtos foram capazes de inibir a formação de TBA-RS na mesma proporção (81% e 79% para GS e PIS, respectivamente).

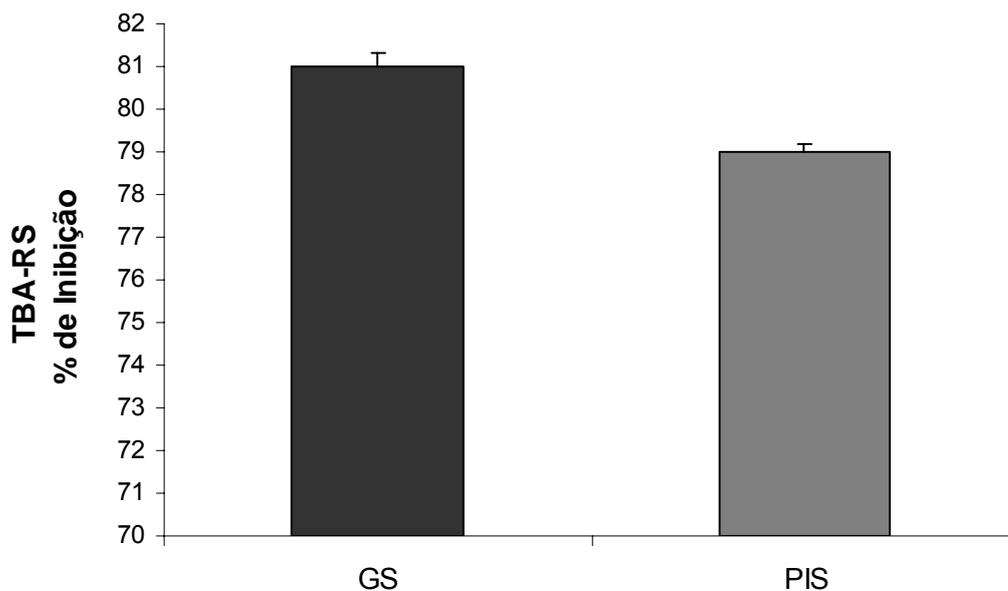


Figura 9. Percentual de Inibição da formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de fígado de ratos incubados com um sistema gerador de radicais livres e acrescentados Gérmen de Soja (GS), Proteína Isolada de Soja (PIS) ou tampão fosfato de potássio 10 mmol/L, pH 7,6 (para os controles). Os resultados estão representados em percentual de inibição de TBA-RS, média \pm D.P. de homogeneizado de fígado de 6 ratos por grupo. Valor médio do grupo controle = 5,95 μ moles MDA/mg proteína. Não houve diferença significativa.

5.2 – Experimentos *in vivo*

5.2.1 – Consumo Alimentar Diário

Após o estudo *in vitro*, iniciamos os tratamentos dietéticos com ratos Wistar machos. Oferecemos uma dieta à base de PIS para um grupo de animais e uma dieta à base de caseína para outro grupo de animais.

Os tratamentos dietéticos iniciaram com animais de 3 semanas de vida e, durante 9 semanas de tratamento, foram avaliados o consumo de ração e ganho de peso corporal.

A média de ingestão diária de ração nos grupos alimentados com caseína foi de 20,5g para o grupo CC e de 17g para os grupos CI<25% e CI>25%, enquanto que no grupo alimentado com PIS a média de ingestão diária foi de 18g no grupo SC e 17g nos grupos SI<25% e SI>25% (Figura 10). Não houve diferença significativa de consumo de ração entre os grupos estudados.

Considerando os valores médios ingeridos ao longo do tratamento, os animais alimentados com PIS receberam 7mg de isoflavonas totais por dia ou 4,7 mg de isoflavonas em equivalentes de agliconas.

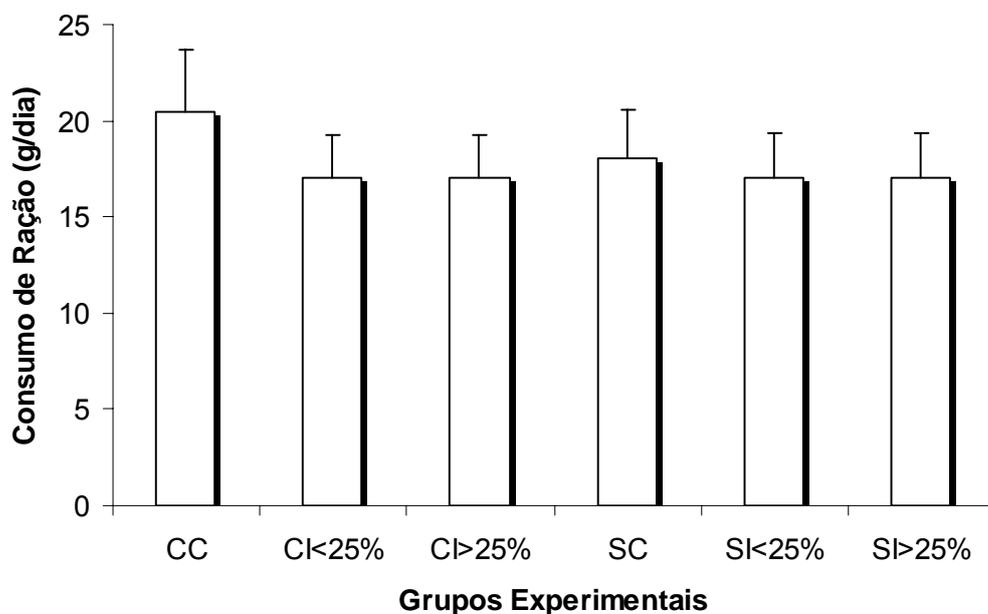


Figura 10. Curva de consumo médio de ração (em gramas). Os valores são expressos como média \pm D. P. de 8 animais por grupo.

CC, ratos alimentados com caseína e cirurgia fictícia de infarto; CI<25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto menor que 25%; CI>25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto maior que 25%; SC, ratos alimentados com PIS e cirurgia fictícia de infarto; SI<25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto menor que 25%; SI>25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto maior que 25%. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.2.2 – Mortalidade dos Animais pós-infarto do Miocárdio

Foram utilizados 158 animais neste estudo, 69 receberam dieta à base de PIS e 89 receberam dieta à base de caseína. A mortalidade durante o procedimento cirúrgico foi semelhante em ambos os grupos (10%), provavelmente por insuficiência respiratória.

No grupo alimentado com caseína, morreram 24 animais a partir do 2º dia pós-IM até o 12º dia, provavelmente devido a infartos grandes. Sobreviveram 47 animais, dos quais 22 submetidos à cirurgia fictícia de ligadura da artéria coronária (CC = caseína controle) e 25 submetidos à ligadura da artéria coronária (CI = caseína infartados).

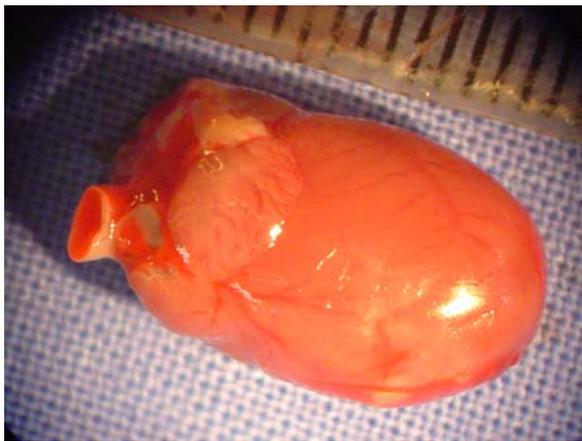
No grupo alimentado com PIS, morreram 10 animais a partir do 2º dia pós-IM até o 12º dia, provavelmente devido a infartos grandes. Sobreviveram 44 animais, dos quais 24 submetidos à cirurgia fictícia de ligadura da artéria coronária (SC = soja controle) e 20 submetidos à ligadura da artéria coronária (SI = soja infartados).

Após a separação da cicatriz do tecido cardíaco, foi identificado que as áreas de infarto do ventrículo esquerdo variaram entre 10% e 40%. A mediana das áreas de infarto ficou em torno de 25% de área de infarto, por isso os animais infartados foram divididos em dois

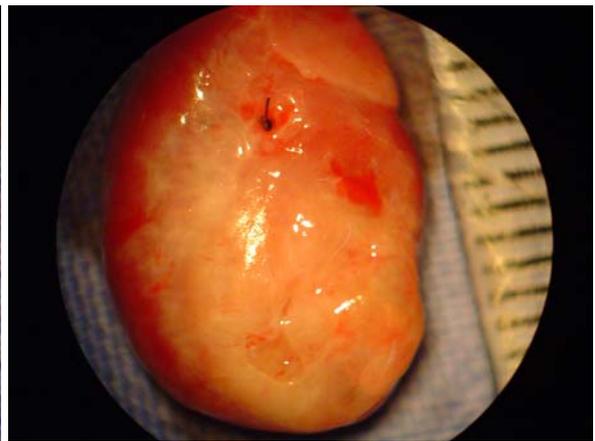
grupos de acordo com o tamanho da cicatriz. Um grupo de animais com área de infarto até 25% (<25%) e outro grupo com área de infarto superior a 25% (>25%).

Não houve diferença significativa na taxa de mortalidade dos animais pós-IM pelo teste do Qui-quadrado (1,86; $p = 0,173$) e o teste log-rank mostrou que não existe diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevivência dos dois grupos (valor de $p = 0,316$).

A figura 11 mostra a diferença macroscópica e histológica entre os corações submetidos à cirurgia fictícia e à de ligadura da artéria coronária.



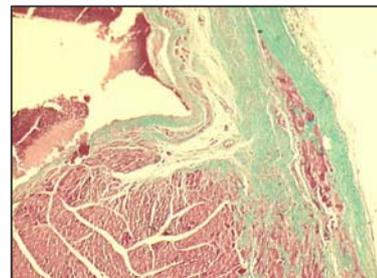
Grupo Controle



Grupo Infartado
Área de Infarto >25%



Análise Histológica
Tecido cardíaco
Grupo Controle



Análise Histológica
Tecido cardíaco infartado, área de
colágeno corada com Tricrômico verde.

Figura 11. Corações e análise histológica do tecido cardíaco de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Grupo Controle) e à cirurgia de ligadura da artéria coronária (infarto).

5.2.3 – Parâmetros Biométricos e Morfométricos

A tabela 5 mostra os parâmetros biométricos e morfométricos dos seis grupos experimentais. O ganho de peso corporal foi 12% menor no grupo SC comparado ao grupo CC ($P < 0,01$). O índice de Lee e a quantidade de gordura marrom interescapular foram estatisticamente semelhantes nos seis grupos. O grupo SC apresentou uma redução de gordura abdominal em torno de 30% ($P < 0,001$) em relação ao grupo CC. A razão peso úmido/peso corporal do pulmão e do fígado aumentou significativamente, em relação ao grupo CC ($p < 0,001$), em ambos os grupos infartados alimentados com caseína, sugerindo a congestão destes órgãos. Estas modificações foram significativamente atenuadas nos grupos infartados alimentados com PIS. A hipertrofia cardíaca avaliada pela razão do peso do coração/peso corporal foi observada em ambos os grupos infartados alimentados com caseína. Nos grupos alimentados com PIS, apenas os ratos do grupo SI>25% desenvolveram hipertrofia cardíaca.

Tabela 5 - Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos experimentais após 9 semanas de tratamento dietético.

| Parâmetro | CC | CI<25% | CI>25% | SC | SI<25% | SI>25% |
|--|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Ganho de peso corporal (g) | 282 ± 11 | 264 ± 16 | 257 ± 6,6 ^a | 248 ± 11 ^a | 247 ± 5,0 ^a | 232 ± 8,0 ^a |
| Peso coração/peso corporalx10 (mg/g) | 2,8 ± 0,3 | 3,3 ± 0,33 ^b | 3,3 ± 0,11 ^b | 2,8 ± 0,2 | 2,9 ± 0,13 ^c | 3,4 ± 0,3 ^d |
| Tecido adiposo abdominal (g) | 17,0 ± 1,9 | 15,0 ± 1,9 ^b | 13 ± 0,7 ^f | 12,0 ± 1,5 ^f | 9,0 ± 0,4 ^f | 9,0 ± 0,6 ^f |
| Tecido adiposo interescapular marrom (g) | 0,95 ± 0,1 | 0,94 ± 0,09 | 0,87 ± 0,07 | 1,0 ± 0,08 | 0,98 ± 0,06 | 1,0 ± 0,09 |
| Índice de Lee | 0,29 ± 0,001 | 0,29 ± 0,001 | 0,29 ± 0,001 | 0,29 ± 0,001 | 0,29 ± 0,001 | 0,29 ± 0,001 |
| Peso úmido do pulmão/peso corporalx10(mg/g) | 6,6 ± 1,3 | 8,2 ± 0,7 ^e | 11,6 ± 2,6 ^f | 6,01 ± 0,6 | 5,9 ± 0,8 ^{c,e} | 6,9 ± 0,6 ^e |
| Peso úmido do fígado/peso corporalx10 (mg/g) | 31,4 ± 2,2 | 36,3 ± 3,2 ^f | 37,7 ± 0,6 ^f | 31,6 ± 1,4 | 32,7 ± 1,2 ^{c,e} | 35,2 ± 1,0 ^g |

Dados expressos em média ± D. P. para 8 animais/grupo. Tecido adiposo abdominal (tecido adiposo epididimal, perirrenal e mesentérico). CC, ratos alimentados com caseína e cirurgia fictícia de infarto; CI<25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto menor que 25%; CI>25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto maior que 25%; SC, ratos alimentados com PIS e cirurgia fictícia de infarto; SI<25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto menor que 25%; SI>25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto maior que 25%.

^adiferente do CC (P<0,01); ^bdiferente do CC (P<0,05); ^cdiferente do CI<25% (P<0,05); ^ddiferente do SC (P<0,05); ^ediferente do CI>25% (P<0,001); ^fdiferente do CC (P<0,001); ^gdiferente do SC (P<0,01).

5.2.4 – Parâmetros Hemodinâmicos

A tabela 6 descreve os valores hemodinâmicos registrados nos ratos anestesiados. Sinais típicos de insuficiência cardíaca (aumento da PDFVE e diminuição da $^+dP/dt$ máxima, assim como diminuição da pressão arterial) foram observados nos animais infartados alimentados com caseína, principalmente no grupo CI>25%. A PDFVE aumentou 174% (P<0,001) no grupo CI<25% quando comparado ao grupo CS e 286% (P<0,001) no grupo CI>25% comparado ao grupo CS. O prejuízo hemodinâmico das funções diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo foi significativamente atenuado nos ratos infartados tratados com PIS. Por exemplo, no grupo SI<25% a PDFVE aumentou em torno de 70% (P<0,01) quando comparada ao grupo SS e em torno de 225% (P<0,001) no grupo SI>25%, valores de 104% e 61% menores do que aqueles medidos nos grupos CI<25% e CI>25%, respectivamente. A diminuição do índice de contratilidade do ventrículo esquerdo ($^+dP/dt$ máx) foi de 22% (P<0,001) no grupo CI>25% e apenas de 9% (P<0,05) no grupo SI>25% quando comparados aos seus respectivos controles (CC e SC).

Tabela 6 - Parâmetros hemodinâmicos dos diferentes grupos experimentais após 9 semanas de tratamento dietético.

| Parâmetro | CC | CI<25% | CI>25% | SC | SI<25% | SI>25% |
|-------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|-------------|--------------------------|-----------------------------|
| PSVE (mmHg) | 148 ± 7,3 | 116 ± 9,9 ^a | 90 ± 7,8 ^{a,b} | 142 ± 7,5 | 128 ± 7,9 ^{c,f} | 110 ± 4,8 ^{c,d,e} |
| PDFVE (mmHg) | 5,7 ± 0,6 | 15,6 ± 0,5 ^a | 22,0 ± 0,9 ^{a,b} | 5,1 ± 0,5 | 8,7 ± 1,2 ^{c,b} | 16,6 ± 1,2 ^{d,e,k} |
| +dP/dt (mmHg/seg) | 7181 ± 687 | 6061 ± 267 ^a | 5611 ± 751 ^{a,b} | 7186 ± 493 | 7013 ± 141 ^g | 6570 ± 276 ^h |
| -dP/dt (mmHg/seg) | -5610 ± 254 | -5009 ± 103 ^a | -4693 ± 99 ^{a,f} | -5433 ± 344 | -5253 ± 196 | -5085 ± 125 ^{c,i} |
| PAM (mmHg) | 121 ± 13 | 104 ± 12 ^j | 86 ± 9 ^{a,g} | 122 ± 8 | 106 ± 4 ^{d,h,j} | 96 ± 8 ^k |

Dados expressos em média ± D. P. para 8 animais/grupo. CC, ratos alimentados com caseína e cirurgia fictícia de infarto; CI<25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto menor que 25%; CI>25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto maior que 25%; SC, ratos alimentados com PIS e cirurgia fictícia de infarto; SI<25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto menor que 25%; SI>25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto maior que 25%.

PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDFVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; ± dP/dt, derivadas de pressão do ventrículo esquerdo; PAM, pressão aórtica média.

^adiferente do CC (P< 0,001); ^bdiferente do CI<25% (P<0,001); ^cdiferente do SC (P<0,01); ^ddiferente do CI>25% (P<0,001); ^ediferente do SI<25% (P<0,001); ^fdiferente do CI<25% (P<0,05); ^gdiferente do CI<25% (P<0,01); ^hdiferente do SC (P<0,05); ⁱdiferente do CI>25% (P<0,05); ^jdiferente do CC (P<0,05); ^kdiferente do SC (P<0,001).

5.2.5 – Estresse Oxidativo no Miocárdio

5.2.5.1 – Enzimas Antioxidantes

As defesas antioxidantes enzimáticas foram avaliadas em homogeneizado de músculo cardíaco dos seis grupos experimentais. A atividade das enzimas antioxidantes aumentou significativamente nos animais não-infartados alimentados com PIS (SC). A atividade da SOD aumentou em 72% ($P < 0,001$), a CAT e a GPx em 24% ($P < 0,001$) quando comparadas ao grupo CC (Tabela 7). O infarto diminuiu a atividade destas enzimas, mas mesmo sob o estresse do infarto, os ratos alimentados com PIS mantiveram a atividade das enzimas antioxidantes significativamente superior à atividade das enzimas nos grupos alimentados com caseína. A atividade da SOD foi 96% ($P < 0,001$) maior no grupo SI<25% e 61% ($P < 0,001$) maior no grupo SI>25% do que nos grupos CI<25% e CI>25%, respectivamente. Semelhantes resultados foram observados em relação à atividade da CAT, a enzima apresentou 43% ($P < 0,001$) mais atividade no grupo SI<25% e 39% ($P < 0,01$) mais atividade no grupo SI>25% quando comparados aos grupos CI<25% e CI>25%, respectivamente. A GPx mostrou maior atividade nos grupos SI<25% e SI>25% quando

comparadas aos grupos CI<25% e CI>25%, respectivamente, mas não foram diferenças significativas.

Tabela 7 - Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) em homegeneizado de músculo cardíaco dos diferentes grupos experimentais após 9 semanas de tratamento dietético.

| Parâmetro | CC | CI<25% | CI>25% | SC | SI<25% | SI>25% |
|-------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| SOD (U/mg proteína) | 22,6 ± 3,0 | 13,7 ± 3,1 ^a | 12,8 ± 1,1 ^a | 38,9 ± 3,8 ^a | 26,9 ± 2,4 ^b | 20,6 ± 2,3 ^{c, d} |
| CAT (pmol/mg proteína) | 76,6 ± 7,6 | 52,3 ± 6,7 ^a | 37,4 ± 5,7 ^a | 94,7 ± 11,4 ^a | 75,1 ± 4,7 ^b | 51,9 ± 4,0 ^{d,e,f} |
| GPx (nmol/min/mg prot.) | 14,6 ± 2,3 | 11,1 ± 1,8 ^a | 7,5 ± 1,7 ^{a,g} | 18,1 ± 1,9 ^a | 12,4 ± 1,2 ^f | 9,4 ± 1,7 ^{f, h} |

Dados expressos em média ± D. P. para 8 animais/grupo. CC, ratos alimentados com caseína e cirurgia fictícia de infarto; CI<25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto menor que 25%; CI>25%, ratos alimentados com caseína, com área de infarto maior que 25%; SC, ratos alimentados com PIS e cirurgia fictícia de infarto; SI<25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto menor que 25%; SI>25%, ratos alimentados com PIS, com área de infarto maior que 25%.

^adiferente do CC (P<0,001); ^bdiferente do SC e CI<25% (P<0,001); ^cdiferente do SC e CI>25% (P<0,001); ^ddiferente do SI<25% (P<0,01); ^ediferente do CI>25% (P<0,01); ^fdiferente do SC (P<0,001); ^gdiferente do CI<25% (P<0,01) e ^hdiferente do SI<25% (P<0,05).

5.2.5.2 – Dano Oxidativo a Proteínas e a Lipídios

O significativo aumento do dano oxidativo às proteínas nos ratos infartados, avaliado pela concentração de grupos carbonilas em homogeneizado de músculo cardíaco, foi observado nos grupos com áreas grandes de infarto (Figura 12 A), mas o dano oxidativo às proteínas foi significativamente atenuado no grupo SI>25% quando comparado com o grupo CI>25% ($P<0,001$). Os grupos CI<25% e SI<25% não apresentaram diferença significativa entre si e nem em relação aos seus controles CC e SC, respectivamente.

A LPO avaliada pela técnica de QL em homogeneizado de músculo cardíaco, foi significativamente reduzida no grupo SC quando comparado ao grupo CC (CC = 5.900 ± 700 cps/mg protein vs SC = 4.600 ± 900 cps/mg protein; $P<0,001$). A QL aumentou significativamente de acordo com a área de infarto em ambos os grupos, mas foi minimizada de forma significativa nos grupos alimentados com PIS (Figura 12 B). A LPO aumentou 80% ($P<0,001$) no grupo CI<25% e 149% ($P<0,001$) no grupo CI>25% quando comparado ao CC e somente 28% ($P<0,01$) no grupo SI<25% e 54% ($P<0,01$) no grupo SI>25% quando comparado ao SC.

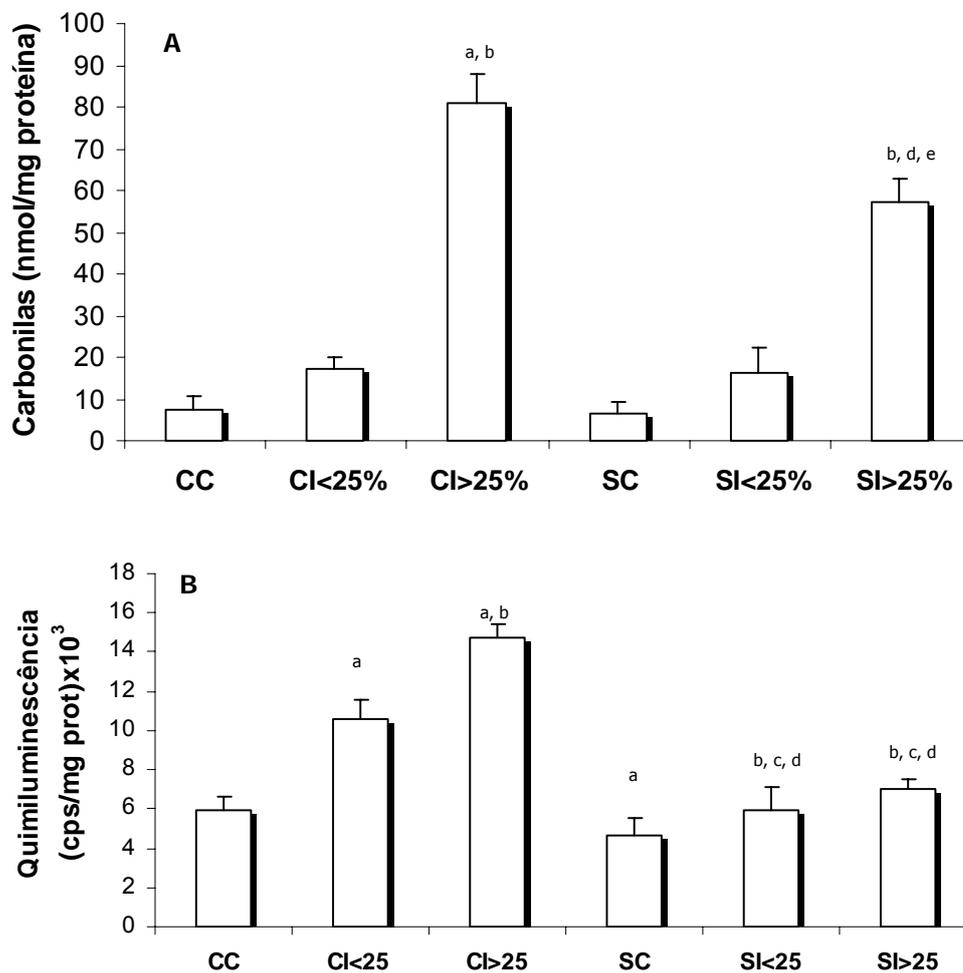


Figura 12. Efeito de 9 semanas de tratamento dietético sobre o dano oxidativo em homogeneizado de músculo cardíaco dos diferentes grupos experimentais. **A** – Dano oxidativo às proteínas, representado por nmoles de carbonilas por mg de proteína. **B** – Dano oxidativo a lipídios, determinado através da técnica de quimiluminescência [(cps/mg de proteína) $\times 10^3$]. Resultados expressos em média \pm D.P. de 8 animais por grupo. As legendas dos grupos estão representadas na Tabela 7.

^adiferente do CC ($P < 0,001$); ^bdiferente do CI<25% ($P < 0,001$); ^cdiferente do SC ($P < 0,01$); ^ddiferente do CI>25% ($P < 0,001$) e ^ediferente do SC ($P < 0,001$).

5.2.6 – Correlações de Pearson

A figura 13 mostra os gráficos das correlações de Pearson entre a PDFVE e alguns dos parâmetros de estresse oxidativo avaliados.

A PDFVE mostrou uma correlação positiva com a QL nos animais alimentados com caseína ($r=0,95$; $P=0,04$), mas não houve uma correlação significativa nos animais alimentados com PIS (Figura 13 A).

A PDFVE mostrou correlação positiva com a concentração de carbonilas em ambos os grupos, alimentados com caseína e PIS, ($r=0,89$; $P=0,01$) (Figura 13 B) e mostrou correlação negativa com a atividade da catalase ($r=- 0,97$; $P=0,001$) de ambos os grupos (Figura 13 C). Não houve correlação entre a PDFVE e os outros parâmetros estudados.

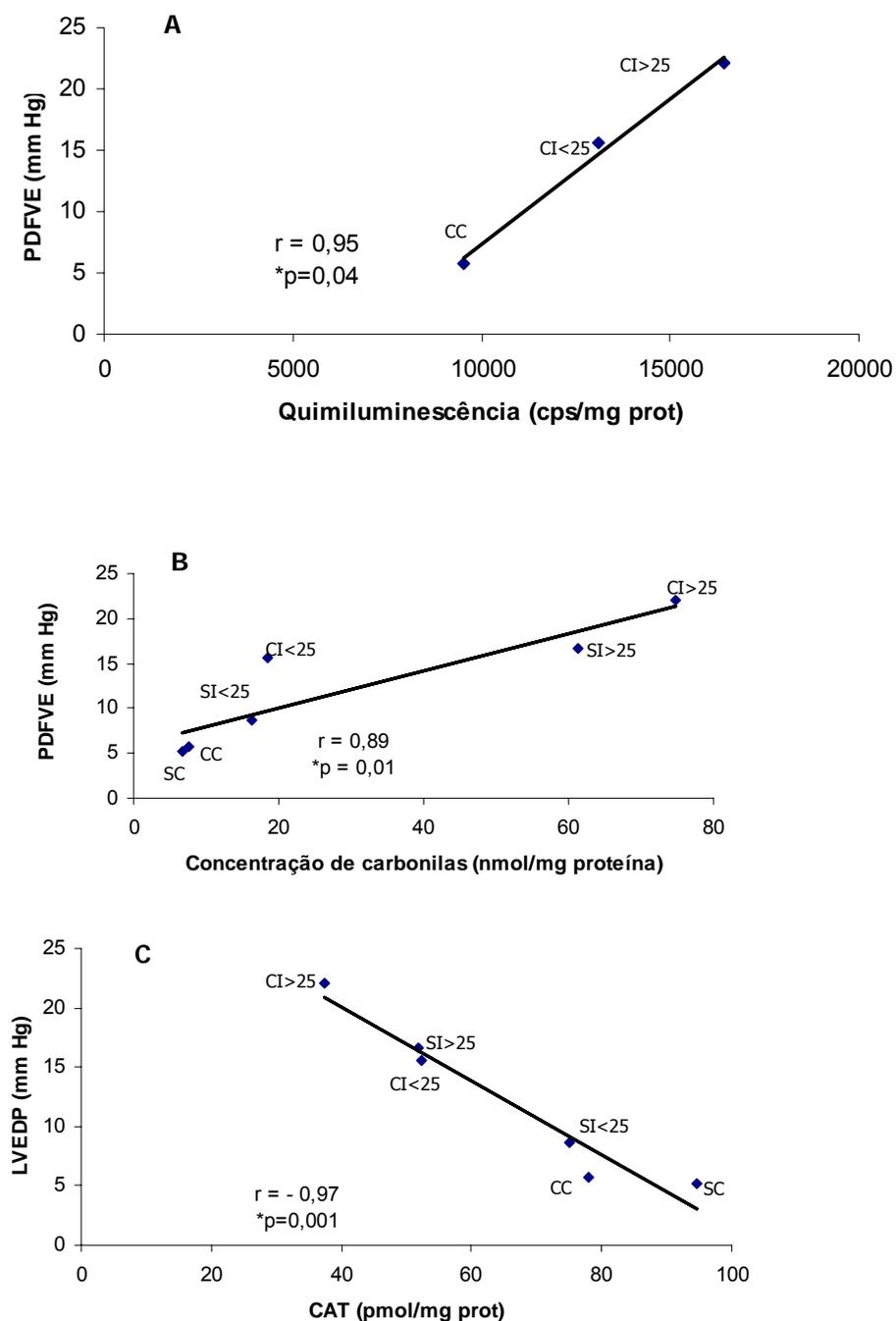


Figura 13. Correlações entre a PDFVE e parâmetros de estresse oxidativo. **A** – Correlação entre PDFVE e QL dos animais tratados com caseína: CC, CI<25% e CI>25%. $r=0,95$; $P=0,04$. **B** – Correlação entre PDFVE e concentração de carbonilas nos grupos: CC, SC, CI<25%, SI<25%, CI>25% e SI>25%. $r=0,89$; $P=0,01$. **C** - Correlação entre PDFVE e atividade da CAT nos grupos: CC, SC, CI<25%, SI<25%, CI>25% e SI>25%. $r=-0,97$; $P=0,001$.

5.2.7 – Parâmetros Avaliados em Eritrócitos e Plasma

Na tabela 8, analisamos o perfil antioxidante sistêmico dos animais tratados com dieta à base de PIS ou caseína. Em eritrócitos, foram determinadas as técnicas de QL, SOD, CAT e GPx e no plasma foram determinados os níveis de nitritos e nitratos.

Ao analisar os grupos não-infartados, verificamos que, em eritrócitos de ratos tratados com PIS, a atividade das três enzimas antioxidantes apresentou-se significativamente maior (em torno de 49% ($P<0,01$), 142% ($P<0,001$) e 11% ($P<0,01$) para SOD, CAT e GPx, respectivamente) e a QL apresentou-se reduzida, mas não significativamente, quando comparados aos ratos tratados com caseína.

Estimamos a concentração de óxido nítrico (NO) no plasma, através das medidas dos seus metabólitos (nitritos e nitratos). Da mesma forma que as enzimas antioxidantes, o conteúdo de nitritos e nitratos também aumentou no grupo não-infartado tratado com PIS (SC) (em torno de 86% ($P<0,001$) e 50% ($P<0,001$), respectivamente), quando comparado ao grupo CC (Tabela 8).

A tabela 8 mostra um aumento de 155% ($P<0,001$) da LPO nos animais infartados tratados com caseína (CI) quando comparados aos controles (CC). Nos animais infartados que ingeriram PIS, observou-

se um aumento de 120% ($P < 0,001$) na LPO ao comparar com o grupo SC, demonstrando uma redução de 30% ($P < 0,05$) na QL ao compará-los aos animais infartados tratados com caseína.

Podemos observar, na tabela 8, que o IM induziu à redução da atividade das enzimas antioxidantes. No grupo CI, a atividade destas enzimas reduziu em 35% ($P < 0,001$), 75% ($P < 0,001$) e 22% ($P < 0,01$) para SOD, CAT e GPx, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. No grupo SI esta redução não foi tão acentuada, 26% ($P < 0,01$), 67% ($P < 0,001$) e 18% ($P < 0,01$) para SOD, CAT e GPx, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

Observamos uma acentuada redução, em torno de 86% ($P < 0,001$), no conteúdo plasmático de nitritos e nitratos no grupo CI quando comparado ao grupo CC. Esta redução foi menor nos ratos tratados com PIS, sendo esta em torno de 78% ($P < 0,001$) em relação ao grupo SC.

Tabela 8. Efeito de 9 semanas de tratamento dietético sobre parâmetros avaliados no plasma e eritrócitos dos grupos experimentais.

| Parâmetro | CC | SC | CI | SI |
|-------------------------|-----------|------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Eritrócitos | | | | |
| QL (cps/mg Hb) | 9.500±900 | 8.100±800 | 24.200±1.700 ^a | 18.200±1.900 ^{b,e} |
| SOD (U/mg proteína) | 7,8±1,1 | 11,6±1,3 ^d | 5,1±0,9 ^a | 8,6±0,8 ^{c,f} |
| CAT (pmol/mg proteína) | 2,4±0,3 | 5,8±0,5 ^a | 0,6±0,1 ^a | 1,9±0,3 ^b |
| GPx (nmol/min/mg prot.) | 7,0±0,5 | 7,8±0,5 ^d | 5,6±0,6 ^d | 6,4±0,6 ^f |
| Plasma | | | | |
| [Nitritos] (µM) | 0,14±0,01 | 0,26±0,01 ^a | 0,02±0,003 ^a | 0,06±0,002 ^{a,b,e} |
| [Nitratos] (µM) | 1,03±0,04 | 1,55±0,05 ^a | 0,14±0,02 ^a | 0,32±0,02 ^{a,b,e} |

Dados expressos em média ± D. P. para 8 animais/grupo. CC, ratos alimentados com caseína e cirurgia fictícia de infarto; SC, ratos alimentados com PIS e cirurgia fictícia de infarto; Caseína Infarto (CI), ratos infartados, alimentados com caseína; Soja Infarto (SI), ratos infartados, alimentados com PIS.

^adiferente do CC (P<0,001); ^bdiferente do SC (P<0,001); ^cdiferente do CI (P<0,001); ^ddiferente do CC (P<0,01); ^ediferente do CI (P<0,05); ^fdiferente do SC (P<0,01).

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado os benefícios do consumo alimentar de derivados da soja, associando seus efeitos à presença de antioxidantes (LIU et al, 2005; ENGELMAN et al, 2005; YOUSEF et al, 2004).

Nosso estudo comprovou que produtos derivados da soja tem importante capacidade antioxidante e que a dieta à base de proteína isolada de soja é capaz de conferir proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo infarto do miocárdio.

Através dos estudos *in vitro*, observou-se que o GS apresenta maior reatividade antioxidante do que a PIS. Na análise química dos produtos, verificou-se que eles apresentam os mesmos flavonóides, mas em diferentes concentrações. O GS tem grandes quantidades de isoflavonas glicosiladas (sobretudo daidzina) enquanto a PIS apresenta quantidades maiores das principais formas de isoflavonas (as agliconas genisteína e daidzeína). Estas diferenças justificam a reatividade antioxidante de cada um dos compostos.

A capacidade antioxidante é semelhante em ambos os produtos, ou seja, eles têm a capacidade de neutralizar a mesma quantidade de radicais livres.

A fim de testar se os antioxidantes presentes nos produtos derivados de soja podem interagir no sistema biológico, foi analisado o percentual de inibição da LPO. A LPO foi produzida a partir da adição de H₂O₂, ácido ascórbico e sulfato ferroso para induzir o dano oxidativo aos lipídios de membrana de fígado de ratos. A adição de GS e PIS (na concentração de 2%) a este meio de incubação foi capaz de reduzir a LPO produzida. Ambos os produtos exibiram semelhante percentual de inibição, indicando uma boa atividade de neutralizar os radicais livres num sistema biológico.

Como observado nos estudos *in vitro*, a PIS apresenta uma boa capacidade antioxidante (apesar de ter uma reatividade antioxidante menor que o GS). No entanto, a biodisponibilidade de isoflavonas é maior na PIS devido à presença de maiores quantidades de isoflavonas agliconas. Setchel e colaboradores (2002) demonstraram que as isoflavonas glicosiladas não são absorvidas diretamente, mas hidrolisadas no intestino pelas enzimas intestinais (β -glicosidases). De acordo com os estudos de Izumi e colaboradores (2000), as isoflavonas agliconas são absorvidas mais rapidamente e em quantidades maiores do que as formas glicosiladas e os estudos de Lee e colaboradores (2005) demonstraram que a genisteína apresenta melhor capacidade antioxidante do que seus glicosídeos em LDL de seres humanos.

Além da sua capacidade antioxidante, a PIS apresenta um padrão de aminoácidos semelhante ao padrão de referência para aminoácidos essenciais recomendado pela FAO/WHO (1991), o que confere à PIS excelente qualidade nutricional.

A partir da análise dos resultados *in vitro*, verificamos a ação da PIS através da administração dietética a ratos Wistar machos submetidos ao modelo animal de infarto do miocárdio. A PIS foi escolhida por ter a mesma capacidade antioxidante que o GS, por ser um produto purificado, com mais de 90% de proteína, quantidade semelhante à caseína (86,7%) proteína utilizada na dieta controle, e por ser um produto consumido pela população sob diversas formas, pois é um ingrediente amplamente empregado na indústria alimentícia.

Contudo, apesar de ter sido oferecida uma dieta isoproteica e isocalórica aos animais, a ingestão de ração e ganho de peso corporal foi menor nos ratos tratados com PIS do que nos ratos tratados com caseína. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos (SHINJO et al., 1992; AOYAMA, et al., 2000; NAAZ et al., 2003; LEPHART, et al., 2004 e TAKAHASHI et al., 2004), que verificaram que animais alimentados com PIS apresentaram significativamente menor ganho de peso corporal e menor quantidade de tecido adiposo quando comparados aos ratos tratados com

caseína. Os pesquisadores relataram que a ingestão de PIS pode aumentar a saciedade, o que justificaria o menor consumo de ração à base de PIS. Outros pesquisadores relataram que a genisteína aumenta a lipólise e diminui a lipogênese em adipócito de roedores (SZKUDELSKA et al., 2000), por restringir a captação de glicose pelos adipócitos e por inibir as enzimas envolvidas na lipogênese.

O modelo animal de infarto do miocárdio em ratos tem sido utilizado para o estudo das alterações cardíacas pós-infarto, entre elas o remodelamento ventricular. Por ser uma cirurgia efetuada rapidamente e devido às diferenças anatômicas de cada animal, observamos uma variação no tamanho da área de infarto de 3,3 a 46% da circunferência ventricular esquerda, assim como em trabalhos anteriores. Por isso, subdividimos os animais infartados em dois grupos: um grupo com área de infarto inferior a 25% (considerado infarto moderado) e outro com área de infarto superior a 25% (considerado infarto grande) (PFEFFER et al., 1985).

Os ratos infartados e tratados com caseína apresentaram hipertrofia cardíaca em ambos os grupos. Este processo reflete uma resposta adaptativa do miocárdio como parte do remodelamento ventricular pós-infarto. Esta resposta compensatória pode recuperar o volume inicialmente, mas a hipertrofia ventricular e a dilatação têm sido associadas à redução da sobrevivência (PFEFFER e BRAUNWALD,

1990). A dieta à base de PIS preveniu a hipertrofia cardíaca no grupo SI<25%, esse resultado mostra um efeito cardioprotetor, uma vez que a hipertrofia ventricular é um preditor de morbi-mortalidade na população em geral (HAIDER et al, 1998).

Os grupos infartados tratados com caseína apresentaram congestão hepática e pulmonar quando comparados aos seus controles e aos grupos tratados com PIS, sugerindo que estes animais desenvolveram insuficiência cardíaca congestiva. A dieta à base de PIS preveniu completamente a congestão pulmonar nos dois grupos infartados e preveniu a congestão hepática no grupo SI<25%, sugerindo uma melhor função de bomba neste grupo. Os dados de cateterismo cardíaco reforçam esta afirmação, pois a dieta à base de PIS promoveu melhora na função ventricular sistólica e diastólica nos ratos infartados, quando comparados aos tratados com caseína. O IM, nos ratos tratados com caseína, aumentou significativamente a PDFVE, o que indica um aumento do volume residual. Associado a este resultado, foi demonstrada uma diminuição no índice de relaxamento (-dP/dt) nos ratos infartados (CI<25% e CI>25%), estas modificações são semelhantes às aquelas relatadas em estudos anteriores, indicando que os ratos desenvolveram insuficiência cardíaca (PFEFFER & BRAUNWALD , 1990). A dieta à base de PIS foi capaz de modular essas modificações, pois estas apareceram

somente no grupo SI>25% e se assemelharam às modificações identificadas no grupo CI<25%. A função sistólica (avaliada pela PSVE e +dP/dt) também diminuiu nos grupos infartados, no entanto a função ventricular dos grupos SI<25% e SI>25% não foi tão prejudicada. A PAM diminuiu em ambos os grupos infartados, não havendo diferença entre os tratamentos dietéticos. Uma vez que a pressão sistólica dos ratos infartados tratados com PIS melhora em relação aos ratos infartados tratados com caseína, e a PAM não se mostra significativamente alterada, poderia estar ocorrendo uma alteração de resistência periférica total de maneira a se contrapor ao aumento do débito cardíaco que, provavelmente, ocorre com o tratamento dietético à base de PIS. Pouco se sabe sobre o efeito da PIS em termos de contratilidade miocárdica, no entanto, está descrito na literatura um papel vasodilatador do endotélio associado à administração de isoflavonas da soja (SQUADRITO, et al., 2000; SQUADRITO, et al., 2002; MAHN, et al., 2005; SMITH et al., 2005).

Os resultados hemodinâmicos demonstraram que o tratamento com PIS preveniu a progressão do IM ao estágio de IC severa, sugerindo que os ratos tratados com PIS permaneceram no estágio de IC moderada.

Ao comparar a atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado de músculo cardíaco dos grupos não-infartados (CC e

SC), verificamos que a dieta à base de PIS aumentou significativamente a atividade destas enzimas, a SOD aumentou em 72% e a CAT e a GPx em 24%. Semelhantes resultados foram encontrados em estudos que administraram isoflavonas na alimentação dos animais (CAI e WEI, 1996; RÖHRDANZ, et al., 2002).

De acordo com estudos anteriores (HILL & SINGAL, 1996 e 1997), a IC pós-IM em ratos, é correlacionada à diminuição da atividade das enzimas antioxidantes assim como com o aumento do estresse oxidativo. O presente estudo mostrou que a diminuição da função ventricular esquerda nos ratos infartados também estava associada a uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e demonstrou que a dieta à base de PIS melhorou a atividade das enzimas antioxidantes quando comparada com a dieta à base de caseína. As atividades da SOD e CAT foram superiores no grupo tratado com PIS em relação ao grupo tratado com caseína em ambas as áreas de infarto. A diminuição da função cardíaca foi associada a um aumento do dano oxidativo, como demonstrado pela significativa correlação entre o dano à membrana (dano a lipídios e dano às proteínas) e PDFVE, assim como uma correlação inversa entre a PDFVE e a atividade da CAT nos grupos infartados tratados com caseína. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que enfatizaram o aumento na produção das EAO durante o IM (HILL

e SINGAL, 1996; KHAPER e SINGAL, 1997; KHAPER et al., 1998), levando ao dano oxidativo nos lipídios e proteínas do miocárdio. É importante salientar que a LPO está correlacionada à elevação da PDFVE apenas nos ratos infartados tratados com caseína. Nos ratos tratados com PIS não houve esta correlação.

A fim de verificar a influência sistêmica do IM analisamos, em sangue, parâmetros de estresse oxidativo. Nossos resultados demonstraram um grande aumento na QL e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em eritrócitos de animais infartados.

Considerando que o IM produz quantidades apreciáveis de $O_2^{\bullet-}$ e que a SOD, enzima que o detoxifica, está com sua atividade preservada nos ratos tratados com PIS, pode-se supor que parte do efeito tóxico do $O_2^{\bullet-}$ seja neutralizado nesses animais.

O H_2O_2 formado na reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pode ser rapidamente consumido pela CAT, enzima que apresentou um aumento de 100% em sua atividade no grupo SC quando comparado ao grupo CC. Quando o estresse oxidativo foi instalado pela indução do IM, os animais que receberam a dieta à base de PIS estariam mais adaptados do que os tratados com caseína, pois a atividade da CAT estava significativamente elevada. Com a elevação da atividade da CAT, haveria maior eliminação do H_2O_2 formado no processo

oxidativo. O H_2O_2 pode difundir-se da área miocárdica infartada para o sangue e pode ser o principal pró-oxidante nos eritrócitos e agente do dano oxidativo nessas células.

A terceira enzima antioxidante estudada, GPx, também mostrou um perfil semelhante de oscilação como as outras duas enzimas, mas não tão expressivo.

Foram analisados os metabólitos do óxido nítrico (NO) (nitritos e nitratos) no plasma dos animais em estudo. Foi observado um aumento dos metabólitos do NO, sugerindo uma concentração plasmática maior de NO nos ratos alimentados com PIS quando comparados aos alimentados com caseína. Squadrito e colaboradores (2000) verificaram um aumento na expressão da NO sintase endotelial quando a genistéína foi oferecida na dieta e, no estudo realizado por Zhai e colaboradores (2001), também foi identificada maior produção de nitritos em corações de ratos que receberam suplementação de isoflavonas.

Verificamos uma diminuição dos nitritos e nitratos em todos os grupos submetidos à cirurgia de IM do estudo. No entanto, a redução não foi tão acentuada nos grupos tratados com PIS. Como citado anteriormente, o aumento da produção das EAO no IM (IDE et al, 2000), somado aos níveis elevados de NO, pode levar à produção de peroxinitrito, um forte oxidante (OSHIMA et al, 1998). Nos animais

tratados com PIS, como a atividade da SOD é maior, os níveis de $O_2^{\bullet-}$ nos eritrócitos poderia ser menor, gerando menos peroxinitrito. Isto aumentaria a biodisponibilidade de NO, atenuando o remodelamento cardíaco e a apoptose após o IM, como demonstrado por Smith e colaboradores (2005).

Desta forma, verificamos que as alterações observadas no miocárdio em decorrência do IM refletem-se ao nível sistêmico. Por isso, as medidas dos parâmetros de estresse oxidativo sistêmico podem ser adotadas para acompanhar a evolução do estresse oxidativo de pacientes no pós-IM.

Os efeitos dos produtos derivados da soja observados *in vitro* e *in vivo* neste estudo estão relacionados à sua habilidade antioxidante, fazendo destas, substâncias promissoras a serem investigadas como protetoras contra LPO e outros danos causados pelos radicais livres.

Este trabalho demonstra, pela primeira vez, uma melhora da função ventricular pós-IM, evitando a progressão ao estágio de IC severa através da administração dietética de PIS de forma preventiva.

7. CONCLUSÕES

O GS e a PIS, produtos ricos em isoflavonas, apresentam boa quantidade e qualidade antioxidante *in vitro* e, assim, foram capazes de inibir a lipoperoxidação hepática induzida por um sistema gerador de RLs.

A ligadura da artéria coronária esquerda produziu, em ratos tratados com caseína, infarto do miocárdio, hipertrofia cardíaca, disfunção sistólica e diastólica severas, assim como congestão hepática e pulmonar. Estas alterações são características do quadro de IC congestiva. A dieta com PIS reduziu estas alterações, sendo que estes animais apresentavam-se no estágio de IC moderada.

A administração de uma dieta rica em PIS reduziu o estresse oxidativo cardíaco e sistêmico em ratos saudáveis, indicando um papel antioxidante preventivo deste produto.

A melhora na função hemodinâmica e nos parâmetros morfométricos se mostrou associada a uma redução do estresse oxidativo cardíaco e nitrosativo sistêmico nos animais infartados tratados com PIS.

Desta forma, o presente estudo demonstrou a eficácia de uma dieta com PIS em reduzir a disfunção miocárdica pós-infarto por provável ação antioxidante.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados encontrados neste estudo, surgiram novos questionamentos sobre os efeitos da dieta à base de proteína de soja na proteção cardiovascular. Deste modo, sugere-se a continuação do estudo com ratos infartados e alimentados com PIS através dos seguintes objetivos:

- Verificar a expressão gênica das enzimas antioxidantes em homogeneizado de tecido cardíaco, através de Western blot e RT-PCR;
- Avaliar a função mecânica cardíaca, através da perfusão do coração isolado pelo método de Langendorff;
- Analisar a função endotelial através da avaliação da reatividade vascular nos animais alimentados com PIS;
- Investigar mecanismos de ação da PIS na participação do remodelamento ventricular avaliando: apoptose, citocinas inflamatórias, metaloproteinases, etc.
- Verificar se a dieta à base PIS, iniciada após o infarto, é capaz de prevenir a disfunção ventricular na mesma proporção encontrada neste estudo.

REFERÊNCIAS

ADA. Position of The American Dietetic Association: Functional Foods. **J. Am. Diet. Assoc.** 99 (10): 1278-1285, 1999.

ADLERCREUTZ, H.; HOCKERSTED, K. & BANNWART C. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin. **J. Steroid Biochem.** 27: 1135-1144, 1987.

ADLERCREUTZ, H.; MARKKANEN, H. & WATANABE, S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. **Lancet** 342 (8881): 1209-1210, 1993.

ADLERCREUTZ, H. & MAZUR, W. Phyto-oestrogens and western diseases. **Ann. Med.** 29: 95-120, 1995.

ADLERCREUTZ, H.; VAN DER MILDT, J.; KINZEL, J.; ATTALLA, H.; WAHALA, K.; MAKELA, T.; HASE, T. & FOTSIS, T. Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 52(1): 97-103, 1995.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth. Enzymol.** 105: 121-126, 1984.

AHA. **Heart Disease and Stroke Statistics — 2005 Update.**
Dallas, Texas: American Heart Association, 2005.

ALBANESI FILHO, F. M. What is the Current Scenario for Heart Failure in Brazil? **Arq. Bras. Card.** 85 (3):1-2, 2005.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M. & COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **N. Engl. J. Med.** 333 (5): 276-282, 1995.

ANTHONY, M. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. **Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.** 17: 2524-2531, 1997.

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B. & WILLIAMS, J. K. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr.** 68, 1390-1393, 1998.

ANTOZZI, C & ZEVIANI, M. Cardiomyopathies in disorders of oxidative metabolism. **Cardiovasc. Res.** 35: 184-199, 1997.

AOYAMA, T.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K.; HASHIMOTO, Y. & YAMAMOTO, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). **Nutr.** 16: 349-354, 2000.

ARAI, Y.; UEHARA, M.; SATO, Y.; KIMIRA, M.; EBOSHIDA, A.; ADLERCREUTZ, H. & WATANABE, S. Comparison of isoflavone among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogens intake. **J. Epidemiol.** 10: 127-135, 2000.

ARORA, A.; NAIR, M. G. & STRASBURG, G. M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Arch. Biochem. Bioph.** 356: 133-141, 1998.

BARNES, S.; PETERSON, T. G. & COWARD, L. Rationale for use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. **J. Cell Biochem.** 22: 181-187, 1995.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoids determination. In: Buslig BS, Manthey J. A., editors. **Flavonoids Living. Cell.** New York: Klusher Academic, 2000.

BERNARDIS, L. L. & PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J. Endocr.** 40: 527-528, 1968.

BORRADAILE, N. M.; DREU, L. E. de; WILCOX, L. J.; EDWARDS, J. Y. & HUFF, M. W. Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein β secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. **Biochem. J.** 366: 531-539, 2002.

BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. **Food Res. Intern.** 35: 187-193, 2002.

BUEGE, J. A. & AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.** 52: 302-309, 1978.

CAI, Q. & WEI, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. **Nutr. Cancer** 25: 1-7, 1996.

CASSIDY, A.; BINGHAM, S. & SETCHELL, K. Biological effects of isoflavonoids in young women: importance of the chemical composition of soybean products. **Br. J. Nutr.** 74: 587-601, 1995.

CASSIDY, A. & GRIFFIN, B. Phyto-oestrogens: potential role in the prevention of coronary heart disease? **Proc. Nutr. Soc.** 58(1): 193-199, 1999.

CASSIDY, A.; BROWN, J. E.; HAWDON, A.; FAUGHNAN, M. S.; KING, L. J.; MILLWARD, J.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. & SETCHELL, K. D. R. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. **J. Nutr.** 136(1): 45-51, 2006.

CHANCE, B.; SIES, H. & BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** 59(3):527-625, 1979.

CLARKSON, T. B.; ANTHONY, M. S.; WILLIAMS, J. K.; HONORE, E. K. & CLINE, J. M. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 217: 365-368, 1998.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEYB, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J. C.; MORGAN, M. R. A. & WILLIAMSON G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver L-glucosidase activity. **FEBS Letters** 436: 71-75, 1998.

DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in Medicine and Biology. **Acta Physiol Scand.** 40(7):153–168, 1980.

DEMONTY, I.; LAMARCHE, B.; DESHAIES, Y. & JACQUES, H. Role of soy isoflavones in the hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat. **J. Nutr. Biochem.** 13: 671-677, 2002.

DUNCAN, A. M.; PHIPPS, W. R. & KURZER, M. S. Phyto-oestrogens. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol.** 17(2): 253-271, 2003.

DWYER, J. T.; GOLDIN, B. R; SAUL, N.; GUALTIERI, L.; BARAKAT, S. & ADLERCREUTZ, H. Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. **J. Am. Diet. Assoc.** 94: 739-743, 1994.

DZAU, V. J. & RE, R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine – a paradigm shift? **Circulation** 89: 493-497, 1994.

ENGELMAN, H. M.; ALEKEL, D. L.; HANSON, L. N.; KANTHASAMY, A. G. & REDDY, M. B. Blood lipid and oxidative stress responses to soy protein with isoflavones and phytic acid in postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.** 81(3): 590-596, 2005.

ERDMAN, J. W. J. Soy protein and cardiovascular disease – A Statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the AHA. **Circulation** 102: 2555-2559, 2000.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S. & LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch. Biochem. Biophys.** 388 (2): 261-266, 2001.

FANG, Y.; CHEN, B.; HUANG, R. S. & LU, Y. Effect of genistein supplementation on tissue genistein and lipid peroxidation of serum, liver, and low-density lipoprotein in hamsters. **J. Nutr. Biochem.** 15: 142-148, 2004.

FAO - WHO – United Nations University. **Energy and protein requirements.** Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO Tech. Rep. Ser. 724, WHO, Geneva, Switzerland, 1985.

FAO - WHO. **Protein quality evaluation**. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. FAO - Food and Nutrition Paper 51, Rome, Italy, 1991.

FLOHÉ, L. & GUNZLER, W. A. Assay of Glutathione Peroxidase. **Meth. Enzymol.** 105: 114-121, 1984.

GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 17. ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1998.

GARDNER, P. R.; RAINIERI, I.; EPSTEIN, L. B. & WHITE, C. W. Superoxide Radical and Iron Modulate Aconitase Activity in Mammalian Cells. **J. Biol. Chem.** 270 (22):13.399-13.405, 1995.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S. & BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Rad. Biol. Med.** 10: 93-100, 1991.

GOODMAN, M. T.; WILKEN, L. R.; HANKIN, J. N. & KOLONEL, L. N. **The association of dietary phytoestrogens with the risk for endometrial cancer**. Proceedings of Second International

Symposium on the role of soy in preventing and treating chronic diseases. St. Louis (MO): Protein Technology International, 1996.

GRANGER, D. L.; ANSTEY, N. M.; MILLER, W. C. & WEINBERG, J. B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Meth. Enzymol.** 301: 49-61, 1999.

GUO, Q.; RIMBACH, G.; MOINI, H.; WEBER, S. & PACKER, L. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. **Toxicology** 179: 171-180, 2002.

HAIDER, A. W.; LARSON, M. G.; BENJAMIN, E. J. & LEVY, D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. **J. A. C. C.** 32 (5): 1454–1459, 1998.

HALLIWELL, B & GUTTERIDGE, JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. **Meth. Enzymol.** 186: 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Antioxidants: The Basis What They Are and How to Evaluate Them. In SIES, H. (ed) **Antioxidants in diseases:**

Mecanisms and Therapy. (Advances in Pharmacology vol. 38)

Califórnia: Academic Press, 1997.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology**

and Medicine. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: How should we move forward? **Cardiovasc. Res.** 47: 410-418, 2000.

HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. **Cardiovasc. Res.** 39: 60-76, 1998.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol and Therap** 96: 67-202, 2002.

HILL M. F. & SINGAL P. K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **Am. J. Pathol.** 148(1):291-300, 1996.

HILL, M. F. & SINGAL, P. K. Right and left myocardial antioxidant response during heart failure subsequent to myocardial infarction. **Circulation** 96: 2414-2420, 1997.

HO, K. K. L.; PINSKY, J. L.; KANNEL, W. B. & LEVY, D. The epidemiology of heart failure: the Framingham study. **J. Am. Coll. Cardiol.** 22: 6^A-13^A, 1993.

HUTCHINS, A. M.; SLAVIN, J. L. & LAMPE, J. W. Urinary isoflavonoids phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. **J. Am. Diet. Assoc.** 95: 545-51, 1995.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; SUEMATSU, N.; HAYASHIDANI, S.; ICHIKAWA, K.; UTSUMI, H.; MACHIDA, Y.; EGASHIRA, K. & TAKESHITA, A. Direct Evidence for Increased Hydroxyl Radicals Originating From Superoxide in the Failing Myocardium. **Circ. Res.** 86:152-157, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** 3. ed. São Paulo, 1985. 1 v.

IZUMI, T.; PISKULA, M. K., OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y. & KIKUCHI, M. Soy isoflavones are

absorbed faster and in higher amounts than their glycosides in humans. **J. Nutr.** 130: 1695-1699, 2000.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; VIDGEN, E.; VUKSAN, V.; JACKSON, C-J.; AUGUSTIN, L. S. A.; LEE, B.; GARSETTI, M.; AGARWAL, S.; RAO, A. V.; GLORIA B. CAGAMPANG, G. B. & FULGONI, V. Effect of soy-based breakfast cereal on blood lipids and oxidized low-density lipoprotein. **Metabolism** 49 (11): 1496-1500, 2000.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; JACKSON, C. J.; CONNELLY, P. W.; PARKER, T.; FAULKNER, D.; VIDGEN, E.; CUNNANE, S. C.; LEITER, L. A. & JOSSE, R. G. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. **Am. J. Clin. Nutr.** 76: 365-372, 2002.

JUVENIEWICZ, P. E., PALLANTE, M., MONSER, A. & EWING, L. L. Identification of phyto-estrogens in the urine of male dogs. **J. Ster. Biochem.** 31: 987, 1988.

KAPIOTIS, S.; HERMANN, M. & HELD I. Genistein, the dietary derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects

endothelial cells from damage by atherogenic LDL. **Artheroscler. Throb. Vasc. Biol.** 17: 2868-2874, 1997.

KARR, S. C.; LAMPE, J. W.; HUTCHINS, A. M. & SLAVIL, J. L. Urinary isoflavonoids excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. **Am. J. Clin. Nutr.** 66: 46-51, 1997.

KELLY, G. E., JOANNOU, G. E., REEDER, A. Y. & WARING, M. A. The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 209: 40, 1995.

KERRY, N. & ABBEY, M. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro. **Atherosclerosis** 140: 341-347, 1998.

KHAPER, N.; HILL, M. F.; PICHARDO, J. & SINGAL, P. K. Effects of captopril on myocardial oxidative stress changes in post-MI rats. In: ZAHRAKKA, P.; DIXON, I. M. C. BEAMISH, R. E. (eds). **Angiotensin II blockade**. Dhalla N. S. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998.

KHAPER, N. & SINGAL, P. K. Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.** 29: 856-861, 1997.

KIRKMAN, L. M.; LAMPE, J. W.; CAMPBELL, D. R. Urinary lignan and isoflavonoid excretion in men and women consuming vegetable and soy diets. **Nutr. Cancer** 24: 1-12, 1995.

KOMPA, A. R & SUMMERS, R. J. Lidocaine and surgical modification reduces mortality in a rat model of cardiac failure induced by coronary artery ligation. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.** 43: 199-203, 2000.

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B. & GUSTAFSSON, J-A. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . **Endocrinology** 139 (10): 4252-4263, 1998.

LEE, C. H.; YANG, L.; XU, J. Z.; YEUNG, S. Y. V.; HUANG, Y. & CHEN, Z. Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chem.** 90: 735-742, 2005.

LEPHART, E. D.; PORTER, J. P.; LUND, T. D.; BU, L.; SETCHELL, K. D. R.; RAMOZ, G. & CROWLEY, W. R. Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats. **Nutr. & Metabol.** 1(16):1-14, 2004.

LESSA, I. Doenças crônicas não transmissíveis: Bases epidemiológicas. In: Rouquayrol M. Z., Filho, N. A (eds). 5. ed., **Epidemiologia & Saúde**. Rio de Janeiro: Medsi., 1998. 285-299.

LESSA, I. Medical care and deaths due to coronary artery disease in Brazil, 1980-1999. **Arq. Bras. Cardiol.** 81 (4): 336-342, 2003.

LI, T.; DANELISEN, I.; BELLÓ-KLEIN, A. & SINGAL, P K. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. **Cardiovasc. Res.** 46: 523-530, 2000.

LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. **J. Nutr.** 128: 1589-1592, 1998.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. **Free Rad. Res. Comms.** 17:299-311, 1992.

LISSIN, L. W. & COOKE, J. P. Phytoestrogens and cardiovascular health. **J. Am. Coll. Cardiol.** 35(6): 1403-1410, 2000.

LIU, J.; CHANG, S. K. C. & WIESENBORN, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and vivo. **J. Agric. Food Chem.** 53: 2333 – 2340, 2005.

LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A. & MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice. **Tumori.** 71(3): 241–249, 1985.

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. L. & RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-267, 1951.

LU, L. W.; LIN, S. N. & GRADY, J. Altered kinetics and extent urinary daidzein and genistein excretion in women during chronic soya exposure. **Nutr. Cancer.** 26: 289-302, 1996.

LUOMA, J. S.; STRALIN, P.; MARKLUND, S. L.; HILTUNEN, T. P.; SÄRKIOJA, T. & YLÄ-HERTTUALA, S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 18:157-167, 1998.

MAHN, K.; BORRÁS, C.; KNOCK, G. A.; TAYLOR, P.; KHAN, I. Y.; SUGDEN, D.; POSTON, L.; WARD, J. P.; SHARPE, R. M.; VIÑA, J.; AARONSON, P. I. & MANN G. E. Dietary soy isoflavone-induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. **FASEB J.** 19(12): 1755-1757, 2005.

MARKLUND, S. **Handbook of methods for oxygen radical research.** Boca Raton: CRC. Press. 1985.

McALISTER, F. A. & TEO, K. K. The management of congestive heart failure. **Postgrad Med. J.** 73:194-200, 1997.

McCALL, D. Epidemiology, Etiology, and Natural History. In: McCALL, D., RAHIMTOOLA, S. H. editors. **Heart Failure**. 1. ed. United States of America: Chapman and Hall, 1995.

McMURRAY, J. & DARGIE, H. **Chronic heart failure**. Martin Dunitz Ltd. 2nd edition. United Kingdom, 1998.

MENEGHINI, R. A Toxicidade do Oxigênio. **Ciências Hoje** 5 (6): 57 – 62, 1987.

MERZ-DEMLOW, B. E.; DUNCAN, A. M.; WANGEN, K. E.; XU, X.; CARR, T. P. PHIPPS, W. R. & KURZER, M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.** 71: 1462-1469, 2000.

MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 208: 44-50, 1995.

MILL, J. G.; STEFANON, I.; LEITE, C. M. & VASSALO, D. V. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. **Cardiov. Res.** 24: 748-753, 1990.

MONNET, E. & CHACHQUES, J. C. Animal Models of Heart Failure: What Is New? **Ann. Thorac. Surg.** 79:1445–53, 2005.

NAAZ, A.; YELLAYI, S.; ZAKROCZYMSKI, M. A.; BUNICK, D.; DOERGE, D. R.; LUBAHN, D. B. et al. The Soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. **Endocrinol.** 144(8): 3315-3320, 2003.

NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KURISU, Y. & SHIMIZU, H. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. **J. Nutr.** 128: 209-213, 1998.

NESTEL, P. J.; YAMASHITA, T.; SASAHAR, A. T.; POMEROY, S.; DART, A.; KOMESAROFF, P.; OWEN, A. & ABBEY, M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. **Arterios. Thromb. Vasc. Biol.** 17: 3392-3398, 1997.

O'BRIEN, T. & NGUYEN, T. T. Lipids and lipoproteins in women. **Mayo Clin. Proc.** 72: 235-244, 1997.

OHSHIMA, H.; YOSHIE, Y.; AURIOL, S. & GILIBERT, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. **Free Rad. Biol. Med.** 25: 1057-1065, 1998.

PALACE, V. P.; HILL, M. F.; FARAHMAND, F. & SINGAL, P. K. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function following myocardial infarction. **Circulation** 99: 121-126, 1999.

PFEFFER, M. A.; PFEFFER J. M.; STEINBERG C. & FINN P. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ. Res.** 44: 503-512, 1979.

PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; STEINBERG, C. & FINN, P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. **Circulation** 72: 406-412, 1985.

PFEFFER M. A. & BRAUNWALD E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: Experimental observations and clinical implications. **Circulation** 81: 1161-1172, 1990.

POTTER, S.; BAUM, J.; TENG, H.; STILLMAN, R.; SHAY, N. & ERDMAN, J. JR. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.** 68: S1375-S1379, 1998.

RAINES, E. W. & ROSS, R. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. **J. Nutr.** 125: 624S-630S, 1995.

RECORD, I. R.; DREOSTI, I. E. & MC INERNEY, J. K. The antioxidant activity of genistein *in vitro*. **J. Nutr. Biochem.** 6 (9): 481-485, 1995.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H. & FAHEY, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nutr.** 123: 1939-1951, 1993.

REN, M. Q.; KUHN, G.; WEGNER, J. & CHEN, J. Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. **Eur. J. Nutr.** 40: 135-146, 2001.

REZNICK, A. Z. & PACKER, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** 233: 357-363, 1994.

RÖHRDANZ, E.; OHLER, S.; TRAN-THI, Q.H. & KAHL, R. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE. **J. Nutr.** 132: 370-375, 2002.

ROWLAND, I.; FAUGHNAN, M.; HOEY, L.; WAHALA, K.; WILLIAMSON, G. & CASSIDY, A. Bioavailability of phyto-estrogens. **Br. J. Nutr.** 89: 45-58, 2003.

RUIZLARREA, M. B.; MOHAN, A.R.; PAGANGA, G.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P. & RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free Rad. Res.** 26, 63-70, 1997.

SBC. II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. **Arq. Bras. Cardiol.** 72 (supl. 1): 1-30 1999.

SCHREIBER, M. D.; LIU, J. H.; SUBBIAH, M. T.; REBAR, R. W. & SETCHELL, K. D. Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and

cardiovascular disease in normal post-menopausal women. **Menopause** 8 (5): 384-392, 2001.

SETCHEL, K. D. R.; WELSH, M. & LIM, C. K. High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. **J. Chromatogr.** 386: 315, 1987.

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

SETCHELL, K. D. R. & CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **J. Nutr.** 129: 758S-767S, 1999.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZINNER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** 76: 447-453, 2002.

SHELNUTT, S. R.; CIMINO, C. O.; WIGGINS, P. A.; RONIS, M. J. K. & BADGER, T. M. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzeína in men and woman after consumption of soy beverage. **Am. J. Clin. Nutr.** 76: 588-594, 2002.

SHINJO, S.; ASATO, L.; ARAKAKI, S.; KINA, T.; KOHRIN, T.; MORI, M. et al. Comparative effect of casein and soybean protein isolate on body fat accumulation in adult rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** 38: 247-253, 1992.

SIES, H. & MURPHY, M. E. Role of tocopherols in the protection of biological against oxidative damage. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.** 8:211-224, 1991.

SIES, H. Antioxidants in Diseases: Mecanisms and Therapy. **Advances in Pharmacology.** Califórnia: Academic Press. 1997. 38 v.

SINGAL, P. K.; KHAPER. N.; BELLÓ-KLEIN, A. & BHAYANA, M. Oxidative stress status in transition of hypertrophy to heart failure. **Heart failure Reviews** 4: 353-360, 1999.

SINGAL, P. K.; KHAPER. N.; FARAHMAD, F. & BELLÓ-KLEIN, A. Oxidative stress in congestive heart failure. **Curr. Card. Rep.** 2: 206-211, 2000.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; MONETTI, M.; PAZZUCCONI, F. & GATTI, E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. **J. Nutr.** 125 (3): 598S-605S, 1995.

SIRTORI, C. R. & LOVATI, M. R. Soy proteins and cardiovascular disease. **Curr Atheroscler Rep.** 3 (1): 47-53, 2001.

SIZER, F. S. & WHITNEY, E. N. **Nutrição. Conceitos e Controvérsias.** 8. ed. São Paulo: Manole, 2003. 567p.

SMITH Jr, R. S.; AGATA, J.; XIA, C. F.; CHAO, L.; CHAO, J. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. **Life Sciences** 76: 2457-2471, 2005.

SOLAE COMPANY. **Fundamentos da soja – proteína da soja.**

Disponível no endereço eletrônico:

<http://solae.com.br/soyessentials/soyprotein>. Acesso em 04.03.2006.

SOUTHORN, P. & POWIS, G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reaction. **Clin. Proc.** (63):381–389, 1988.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; SQUADRITO, G.; SAITTA, A.; CUCINOTTA, D.; MINUTOLI, L.; DEODATO, B.; FERLITO, M.; CAMPO, G.M.; BOVA, A. & CAPUTI, A. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. **Cardiov. Res.** 45: 454-462, 2000.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; MORABITO, N.; CRISAFULLI, A.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; RUGGERI, P.; CAMPO, G. M.; CALAPAI, G.; CAPUTI, A. P. & SQUADRITO, G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. **Atheroscler.** 163: 339-347, 2002.

STRAMBA-BADIALE, M.; FOX, K. M.; PRIORI, S. G.; COLLINS, P.; DALY, C.; GRAHAM, I.; JONSSON, B.; SCHENCK-GUSTAFSSON, K. &

TENDERA, M. Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European Society of Cardiology. **Eur. Heart J.** 27: 994-1005, 2006.

SUTTON, M. G. & SHARPE, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. **Circulation** 101: 2981-2988, 2000.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L. & SZKUDELSKI, T. Genistein affect lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 75: 265-271, 2000.

TAKAHASHI, Y.; KUSHIRO, M. & IDE, T. Effect of dietary protein on adipose tissue gene expression in mice. **Rep. Nat. Food Res. Inst.** 68: 11-18, 2004.

THOMAS, C. E. Approaches and rationale for the design of synthetic antioxidants as therapeutic agents. In PACKER, L. (ed.) **Handbook of Synthetic Antioxidants**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.

TIKKANEN, M. J.; WÄHÄLÄ, K.; OJALA, S.; VIHMA, V. & ADLERCREUTZ, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low

density lipoprotein oxidation resistance. **Proc Natl Acad Sci USA** 95 (6): 3106-3110, 1998.

TIKKANEN, M. J. & ADLERCREUTZ, H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens – Could they have a role in coronary heart disease prevention? **Biochem Pharmacol** 60: 1-5, 2000.

TONSTAD, S.; SMERUD, K. & HOIE, L. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.** 76: 78-84, 2002.

TSUTSUI, H.; IDE T.; HAYASHIDANI S.; SUEMATSU N.; UTSUMI H.; NAKAMURA R.; EGASHIRA K. & TAKESHITA A. Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury. **Cardiov. Res.** 49:103-109, 2001.

USDA 2002. USDA-IOWA State University Database on the isoflavone content of foods. Release 1.3. USDA <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. Acesso em 18.03.2006.

VAN DER SCHOUW, Y. T.; PIJPE A.; LEBRUN, C. E. I.; BOTS, M. L.; PEETERS, P. H. M.; VAN STRAVEREN, W. A. LAMBERTS, S. W. J. & GROBBEE, D. E. Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. **Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.** 22: 1316-1322, 2002.

VITOLINS, M. Z.; ANTHONY, M. & BURKE, G. L. Soy protein isoflavones, lipids and arterial disease. **Cur. Opin. Lipidol.** 12: 433-437, 2001.

WAGNER, J. D.; CEFALU, W. T. & ANTHONY, M. S. Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. **Metabolism** 46: 698-705, 1997.

WAGNER, J. D.; ZHANG, L.; GREAVES, K. A.; SHADOAN, M. K. & SCHWENKE, D. C. Soy protein reduces the arterial low-density lipoprotein (LDL) concentration and delivery of LDL cholesterol to the arteries of diabetic and nondiabetic male cynomolgus monkeys. **Metabolism** 49: 1188-1196, 2000.

WALKER, H. A.; DEAN, T. S.; SANDERS, T. A.; JACKSON, G.; RITTER, J. M. & CHOWIENCZYK, P. J. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilatation of human forearm vasculature with similar potency to 17 β -estradiol. **Circulation** 103: 258-262, 2001.

WANGEN, K. E.; DUNCAN, A. M.; XU, X. & KURZER, M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 225-331, 2001.

WEI, H.; BOWEN, R. & CAI, Q. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 208: 124-130, 1995.

WHITTEN, P. L. & NAFTOLIN, F. Reproductive actions of fitoestrogens. **Bailliere's Clin. Endocrinol. Metabol.** 12 (4): 667-676, 1998.

WHO. Atlas of Heart Disease and Stroke, Sept. 2004. Disponível no endereço eletrônico: www.worldheart.org. Acesso em 14/11/2005.

WILCOX, J. N. & BLUMENTHAL, B. F. Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. **J. Nutr.** 125: 631S-638S, 1995.

WISEMAN, H.; O' REILY, J. D.; ADLERCREUTZ, H.; MALLET, A. I.; BOWEY, E. A.; ROWLAND, I. R. & SANDERS, T. A. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation. **Am. J. Clin. Nutr.** 72: 395-400, 2000.

XU, X.; HARRIS, K. S.; WANG, H.; MURPHY, P. A. & HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. **J. Nutr.** 125: 2307-2315, 1995.

XU, X.; WANG, H-J.; MURPHY, P. A. & HENDRICH, S. Neither background diet nor type soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. **J. Nutr.** 130: 798-801, 2000.

YAMAMOTO, S.; SOBUE, T.; SAKAKI, S.; KOBAYASHI, M.; ARAI, Y.; UEHARA, M.; ADLERCREUTZ, H.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, T.; LITOI, Y.; IWASE, Y.; AKABANE, M. & TSUGANE, S. Validity and reproducibility of a self-administered food-frequency questionnaire to

assess isoflavone intake in a Japanese population in comparison with dietary records and blood and urine isoflavones. **J. Nutr.** 131: 2741-2747, 2001.

YOUSEF, M. I.; KAMEL, K.I.; ESMAIL, A. M. & BAGHDADI, H. H. Antioxidant activities and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits. **Food Chem. Tox.** 42: 1497-1503, 2004.

YU, P. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Reviews.** 74(1):139–162, 1994.

ZHAI, P.; EURELL, T. E.; COTTHAUS, R. P.; JEFFERY, E. H.; BAHR, J. M. & GROSS, D. R. Effects of dietary phytoestrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated female rat hearts. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.** 281: H1223-H1232, 2001.

ZHAN, S. & HO, S. C. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. **Am. J. Clin. Nutr.** 81: 397-408, 2005.

ZHANG, X.; SHU, X. O.; GAO, Y-T.; YANG, G.; LI, Q.; LI, H.; JIN, F. & ZHENG, W. Soy food consumption is associated with lower risk of

coronary heart disease in Chinese women. **J. Nutr.** 133: 2874-2878, 2003.

APÊNDICE A

ARTIGO 1

**Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and
preserves ventricular function in rats with myocardial
infarction**

Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats
with myocardial infarction

MARTINE KIENZLE HAGEN^{1,2}, ANA RAQUEL LEHENBAEUR¹, ANA CAROLINA PALUDO¹, PAULO SCHENKEL¹, LESSANE GONÇALVES^{1,2}, TÂNIA GATELLI FERNANDES¹, RAFAELA CARON¹, SUSANA LLESUY¹, JOSÉ GERALDO MILL³, ADRIANE BELLÓ-KLEIN¹.

¹Cardiovascular Physiology Laboratory at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ²Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ³Physiological Sciences Department, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil.

Running Title: Soy Protein and Myocardial Infarction

Address for Correspondence: Dr. Adriane Belló-Klein

Cardiovascular Physiology Laboratory
Federal University of Rio Grande do Sul
Av. Sarmiento Leite 500
CEP: 90050170
Porto Alegre
BRAZIL
Tel.: (51) 3316-3621
Fax: (51) 3316-3166
E-mail: belklein@ufrgs.br

Abstract:

We investigated the effects of an isolated soy protein (ISP) diet offered during 9 weeks to rats submitted to myocardial infarction (MI). Male Wistar rats were assigned into six groups: Sham Casein (SC); Infarct Casein<25% (IC<25%); Infarct Casein>25% (IC>25%); Sham Soy (SS); Infarct Soy<25% (IS<25%); and Infarct Soy>25% (IS>25%). MI surgery was performed at the fifth week, and one month later, the animals were hemodynamically assessed to evaluate left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), contractility and relaxation indexes (\pm dP/dt), and mean aortic pressure (MAP). Immediately after, the rats were sacrificed by decapitation, and hearts were excised. The scar tissue was separated to estimate the infarct size. Lung and liver were also collected. Oxidative stress was evaluated in heart homogenates through chemiluminescence (CL), carbonyl groups, and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The infarcted rats fed with casein showed cardiac hypertrophy, lung and liver congestion, increased LVEDP and $-$ dP/dt, decreased LVSP, $+$ dP/dt, and MAP, typical signals of heart failure. Ventricular dysfunction was correlated with increased myocardial oxidative damage as seen by CL and carbonyl groups data (3 and 10-fold increase, respectively) in the infarcted group. ISP diet was able to improve ventricular systolic and diastolic function and decrease oxidative stress in infarcted rats. The overall results confirm the preventive role of soy-derived products in terms of post-MI myocardial dysfunction probably by an antioxidant action.

Key words: heart failure, hemodynamics, infarction, oxygen radicals, isolated soy protein.

1. Introduction

Coronary heart disease (CHD) is the leading cause of mortality in the industrialized world, causing over 40% of all deaths in the United States and Western Europe [1]. In the past 30 years, numerous studies have shown that soy consumption improves the plasmatic lipid profile and have suggested that soy and soy components may protect against CHD [2, 3]. The exact mechanisms of such protection are still under discussion. However, well-documented experimental studies have shown beneficial effects of soy in serum lipids including [4], reduction of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglycerides [5, 6], increasing LDL oxidation resistance [7], improving vascular reactivity [8], inhibiting thrombus formation and suppressing smooth muscle cell proliferation and migration [9], and reducing homocysteine concentrations may also contribute to reduce CHD [10].

The Food and Drug Administration (FDA) in USA has recently approved a health claim for soy since laboratory investigations, clinical trials and epidemiological data indicate that high soy consumption (at least 25g per day) associated with low saturated fat intake reduce the risk of CHD [11]. Soy products, as Isolated Soy Protein (ISP), contain a significant amount of isoflavones, such as genistein and daidzein. The average dietary intake of soy protein in Eastern countries, such as Japan, where the incidence of CHD is significantly lower compared with Western countries figures, is around 55 g/day [3, 12].

Previous studies have indicated that isoflavones exhibit free radical-scavenging action [13, 14]. They also may increase the activity of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, thus inhibiting the superoxide generation by xanthine and xanthine oxidase system [15].

There is increasing evidence that oxidative stress plays a major role in the development and progression of left ventricular (LV) remodeling and failure that occur after myocardial infarction (MI). The degree of oxidative stress and the severity of subsequent myocardial damage might depend on the imbalance between excess production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defense within the heart. Increased ROS production can result in myocyte hypertrophy,

apoptosis, and interstitial fibrosis, which may contribute to the development of depressed cardiac function and progression of cardiac failure [16]. Khaper et al. [17] have demonstrated decreased SOD expression in the infarcted rat heart. Other antioxidant defenses, catalase and glutathione peroxidase, were likewise reduced in experimental MI [18]. The overexpression of glutathione peroxidase inhibited LV remodeling and failure after MI in mice [19]. Therefore strong evidences have been accumulated for potential benefits of soy products on cardiovascular disease; however no study has assessed the association between dietary soy intake and cardiac function following acute myocardial infarction (MI).

Thus, this study was designed to test the hypothesis that the use of an ISP diet improves the ventricular function of infarcted rats, by modulating myocardial oxidative stress.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals and Components of the diets

Casein was purchased from Farmaquímica, Porto Alegre, Brazil. Isolated soy protein (ISP - Samprosoy 90LH) and soybean oil were gifted from Bunge Alimentos (now The Solae Company) - Brazil. Mineral mixture and vitamin mixture were gifted from Roche Ltd. Fiber was gifted from Colorcon do Brazil and choline bitartrate were gifted from Valdequímica Produtos Químicos Ltda, Porto Alegre, Brazil. L-metionine was purchased from Merck, Rio de Janeiro, Brazil. Tert-Butylhydroquinone (TBHQ) was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). All other compounds were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Animals and experimental groups

The experimental protocol was reviewed and approved by the Ethical Committee of Federal University of Rio Grande do Sul and was consistent with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Twenty-one-day-old male Wistar

rats were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Rio Grande do Sul. Animals were housed in metabolic cages (one animal each), received water and food ad libitum and were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21° C, 12 hours light/dark cycle). All animals were fed with the experimental diet for nine weeks and were weighed weekly throughout the study. Food intake was measured three times a week.

Animals were assigned into six groups: (1) Sham Casein (SC), sham-operated, fed with casein; (2) Infarct Casein<25% (IC<25%), infarct size less than 25%, fed with casein; (3) Infarct Casein>25% (IC>25%), infarct size greater than 25%, fed with casein; (4) Sham Soy (SS), sham-operated, fed with ISP; (5) Infarct Soy<25% (IS<25%), infarct size less than 25%, fed with ISP; and (6) Infarct Soy>25% (IS>25%), infarct size greater than 25%, fed with ISP.

2.3. Diet

Diet composition were formulated according to the specifications of the AIN-93G [20] and contained similar amounts of protein, fat, carbohydrates, minerals, and vitamin, except for the protein source: casein or ISP (Table 1). The isoflavones in ISP content (analysis was performed at Physical Chemistry Laboratory of the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Paraná, Brazil) was reported as to be 189mg /100g of ISP, 126mg/100g of ISP in Aglycone Equivalents.

2.4. Surgical procedure

Five weeks after the beginning of diet treatment, myocardial infarction (MI) was produced by occlusion of the left coronary artery according to a technique described previously [21]. The animals were submitted to surgical procedure of ligature of the descending anterior branches of the left coronary artery or to a sham-operation in which all surgical procedures were performed except that the suture around coronary artery was not tied. In brief, the animals were anesthetized with ether, the skin was incised along the left sternal border, the anterior thoracic muscles were dissected, the thorax was opened at the fourth intercostal space, the heart was eviscerated, and

the anterior descending branches of the left coronary artery and vein were ligated between the pulmonary outflow tract and the left atrial appendage with 6-0 mononylon thread (Ethicon, Brazil). The heart was then returned into its original position and the thorax was closed with a suture previously prepared. Respiratory movements usually stop when the thorax is opened and they recover spontaneously as soon as the thorax is closed. Otherwise some positive ventilation cycles were induced when spontaneous ventilation was not immediately recovered.

2.5. Hemodynamic assessment

Four weeks after surgery, the animals were weighed and anesthetized with ketamine (90mg/Kg i.p.) and xylazine (10mg/Kg i.p.). A polyethylene catheter (PE 50) was connected to a pressure transducer (Strain-Gauge-Narco Biosystem Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) and coupled to a signal amplifier (Pressure Amplifier HP 8805C) was inserted into the right carotid artery and then advanced into the left ventricular cavity. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular systolic pressure (LVSP), contractile index (+dP/dt) and relaxation index (-dP/dt) were recorded using an automatic acquisition system (AT/MCA CODAS-DATAC. Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA), with sampling frequency of 2KHz.

2.6. Determination of Infarct Size

At the end of the hemodynamic measurements, the animals were sacrificed by decapitation and the hearts were rapidly excised. After blood washout, the ventricular chambers were dissected, blotted, and weighed. The presence of infarction was easily confirmed by gross visualization of the fibrous scar on the anterolateral region of the left ventricle. The scar tissue was separated from the remaining left ventricular myocardium in the infarcted hearts under a microscope. Both fragments were blotted and weighed, and their outlines were drawn on graph paper to estimate the respective areas. Infarct size was calculated and reported as percent of the ventricular endocardial surface covered with scar tissue [22].

2.7. Morphometric evaluation

After hemodynamic recordings the animals were weighed and measured the naso-anal length to determine the Lee Index, an easy method to determine obesity and to evaluate the nutritive status [23]. The Lee Index is calculated by dividing the cube root of the body weight by the naso-anal length. A figure of about 0.300 is considered normal. Immediately after the sacrifice, the abdomen was opened by a midline incision; the heart, lungs and livers were rapidly excised, freed from adhering tissues, and weighed. The right and left ventricle (plus septum) were dissected and weighed. Ventricular hypertrophy was evaluated by chamber weight to body weight ratio. Pulmonary and liver congestion were estimated by wet weight/body weight ratio. Abdominal adipose tissues (perirenal fat, epididymal fat and mesenteric fat) were weighed. Brown adipose tissue was dissected from between the scapular blades (interscapular region) and weighed.

2.8. Tissue preparation

Tissue from both ventricles (including the scar) was homogenized (1.15% w/v KCl and phenyl methyl sulphonyl fluoride - PMSF 20 mmol/L) in Ultra-Turrax. The suspension was centrifuged at 600 g for 10 min at 0-4°C to remove the nuclei and cell debris [24] and supernatants were frozen at -80°C, for further evaluations of carbonyl groups, chemiluminescence and enzyme activities.

2.9. Carbonyl Assay

Tissue homogenates samples were incubated with 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH 10 mM) in 2.5 mol/L HCl solution for 1h at room temperature, in the dark. Samples were vortexed every 15 min. Then 20% TCA (w/v) solution were added in tube samples, left in ice for 10 min and centrifuged for 5 min at 1000 g, to collect protein precipitates. Another wash was performed with 10% TCA. The pellet was washed 3 times with ethanol: ethyl acetate (1:1) (v/v). The final precipitates were dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride solution, left for 10 min at 37°C, and read at 360 nm [25]. Data expressed as nmol per milligram of protein of the homogenates.

2.10. Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence

Chemiluminescence (CL) was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB – Produkter AB, Sweden). Tissue homogenates samples were placed in low-potassium vials at a protein concentration of 0.5 -1.0 mg/mL in a reaction medium consisting of 120 mmol/L KCl, 30 mmol/L phosphate buffer (pH=7.4). Measurements were started by the addition of 3 mmol/L tert-butyl hydroperoxide and data expressed as counts per second per milligram of protein of the homogenates (cps/mg protein) [26].

2.11. Antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as units per milligram of protein, was measured by the method of Marklund [27]. Catalase (CAT) activity was determined by the method of Aebi [28] and expressed as picomol of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein. Glutathione peroxidase (GPx) activity expressed as nanomols of peroxide/ hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein, was measured as described by Flohé and Gunzler [29].

2.12. Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. [30].

2.13. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (S.D.) and were compared by one-way analysis of variance. The Student-Newman-Keuls post hoc test was used to determine significant differences among individual groups. The Graphpad Instat 3.0 software (San Diego, California – USA) was used. The correlation between two variables was analyzed by Pearson's correlation. Values of P < 0.05 were considered significant.

3. Results

Food consumption

Food intake along the 9-week experimental period - The mean daily intake of the casein diet group was 20,5 g while it was 18 g/day in the ISP diet group. Considering mean values of food intake along the treatment, the animals under ISP diet received 7 mg isoflavones/day.

Morphological analysis

Table 2 shows several morphologic indexes of the six groups of rats. The body weight gain was 12% less in the SS group as compared with the SC group ($P < 0.01$). The Lee index and the interscapular adipose tissue were similar in the six groups. Reduction of abdominal fat was roughly 30% smaller in SS group as compared with SC group. The lung weight to body weight ratio increased significantly in both infarcted groups in the casein diet, suggesting development of severe heart failure in these animals. These changes were significantly attenuated in the infarcted groups fed with ISP. Cardiac hypertrophy evaluated by the heart weight to body weight ratio was observed in both infarcted groups under casein diet. In the group fed with ISP, the rats presenting small infarcts did not develop cardiac hypertrophy which only appeared in the group ISP>25% (large infarcts).

Hemodynamic parameters

Table 3 depicts the hemodynamic values recorded in anesthetized animals. Typical signals of heart failure (increase in the LVEDP and decrease of $+dP/dt$ max as well as decrease of arterial pressure) were observed in the animals under casein diet, mainly in the group with large infarcts. Thus LVEDP increased by 174% in the IC<25% group as compared to SC group and by 286% in the IC>25% group as compared to SC group. The hemodynamic impairment of left ventricle diastolic and systolic functions were significantly attenuated in the infarcted groups under ISP diet. For example, in the IS<25% group LVEDP increased by 70% as compared to SS group and by 225% in the IS>25% group, a value 104% and 61% smaller than that measured in the IC<25%

and IC>25% group, respectively. The decrease of the left ventricle contractility index (+dP/dt max) was 22% in the IC>25% and only 9% in the IS>25% group as compared to their respective controls (SC and SS groups).

Myocardial oxidative stress

The enzymatic antioxidant defense was evaluated in heart homogenates of the six groups. It is noteworthy that the antioxidant enzyme activity increased significantly in the uninfarcted rats fed with ISP. SOD activity in the SS group increased by 72%, and CAT and GPx by 24% as compared with the SC group (Table 4). Infarction decreased the activity of these enzymes. SOD activity was 96% higher in the IS<25% group and 61% in the IS>25% group than in the IC<25% and IC>25% groups, respectively. Similar results were observed in relation to CAT activity; it was increased by 43% in the IS<25% group and 39% in the IS>25% group as compared to IC<25% and IC>25% groups, respectively. GPx activity was increased by 12% in the IS<25% group and by 25% in the IS>25% group as compared to IC<25% and IC>25% groups, respectively.

A huge enhancement of the protein oxidative damage, evaluated by the concentration of carbonyl groups in tissue homogenates, was observed in the groups with large infarcts (Fig. 2A). This increase, however, was importantly attenuated in the infarcted group fed with ISP. No significant differences were found in this parameter in the groups with small infarcts as compared to their controls.

Lipid peroxidation (LPO) estimated by tert-butyl-initiated chemiluminescence (CL), was significantly reduced in sham-operated animals fed with ISP (SC = 5,900 ± 700 cps/mg protein vs SS = 4,600 ± 900 cps/mg protein; P<0.001). CL increased significantly in both diet groups as the infarct size increased. CL however was significantly attenuated in the infarcted rats fed with ISP (Fig. 2B). Thus, LPO was increased by 149% in IC>25% group as compared to SC and only 54% in IS>25% group when compared to SS.

LVEDP was positively correlated with CL in casein fed animals ($r = 0.95$; $P = 0.04$). This correlation, however, was not found in the animals fed with ISP. LVEDP was positively correlated

with carbonyl groups ($r = 0.89$; $P = 0.01$) in both casein and ISP and negatively correlated with catalase activity ($r = -0.97$; $P = 0.001$).

4. DISCUSSION

Despite the remarkable improvements in strategies for treating acute MI and subsequent heart failure, understanding of the pathogenesis of heart failure remains a problem. In experimental studies, occurrence of antioxidant deficit has been reported as one of the mechanisms for the development of heart failure [31]. A growing body of evidence suggests that ROS play a major role in the development and progression of LV remodeling and failure. In addition, antioxidants have been shown to exert protective and beneficial effects in experimental heart failure [16, 17, 18, 19]. Soy protein intake has been associated with reduced CHD risk factors, previous studies have suggested that the isoflavones are the cardioprotective component of soy, but there are other components that may affect cholesterol metabolism (saponins, phytic acid and amino acid composition) [32].

Myocardial infarct in rats has been used as a model for a few years. The great advantage of this model is the possibility of keeping the animals alive for long periods until healing of the infarcted myocardial area and appearance of signs of left ventricular remodeling occur. It is worth remembering that after ligation of the left coronary artery, some animals developed extensive infarcts, while others developed small infarcts, and others develop no infarct at all. Consistent with previous studies [33], we observed variation in the infarct size from 10-40% of the left ventricular endocardial circumference, being divided in two groups with infarct size smaller than 25% and greater than 25%.

The body weight gain significantly decreased in rats fed with ISP as compared to with casein diet group. Our results are in agreement with those observed by other studies [34, 35], which found that the animals ISP fed displayed significantly less white adipose tissue and body weight as compared to casein. While there is not extensive data on phytoestrogens and metabolism, other

investigators have reported that genistein, increase lipolysis and decreases lipogenesis in rodent adipocytes [36] by a tyrosine kinase independent mechanism.

Recent study indicated that high consumption of isoflavones in postmenopausal women has been shown to be associated to lower body mass index than those consuming little or no isoflavones [37]. Shinjo et al. [34] reported that soybean protein, compared to casein, did not change total body fat content but significantly lowered the weight of intra-abdominal fat in Wistar rat, like it was observed in our study.

Infarcted animals treated with casein have shown cardiac hypertrophy in both infarct size groups. This process reflects an adaptive response of the myocardium as part of the ventricular remodeling after-MI. This compensatory answer may initially restore stroke volume, but the ventricular hypertrophy and dilation has been associated with a reduction in survival [38]. ISP diet prevented the cardiac hypertrophy in the IS<25% group. Since ventricular hypertrophy is well known to predict morbidity and mortality both in general population, this result shows a cardioprotective effect of ISP diet [39].

The infarcted group fed with casein was characterized by lung and liver congestion as compared to SC group and IS groups. These results suggest that these animals are in a congestive heart failure stage. ISP diet completely prevented lung congestion in all the infarcted animals, and liver congestion in the group with infarct size <25%, suggesting a better pump cardiac function.

Cardiac catheterization data reinforce this affirmation, since that ISP diet promoted improvement of systolic and diastolic LV function in infarcted animals. MI in casein fed rats resulted in a pronounced increase in LVEDP, which denotes an augmented residual volume. Associated with this result, it was demonstrated a decrease in the relaxation index (-dP/dt) in infarcted animals. These changes are similar to those reported earlier indicating that rats are in the heart failure stage [38]. ISP diet was able to modulate these changes in such way that they appear only in the IS>25%, being these parameters comparable to IC<25%. Systolic function (evaluated by LVSP and +dP/dt) was also depressed in MI groups, however in IS groups left ventricle function was not so impaired. MAP was depressed in the IC and IS groups, and it was not changed with ISP treatment.

The overall hemodynamic results demonstrate that ISP treatment avoid the progression of MI to a severe heart failure stage, suggesting that ISP treated animals are in a stage of mild heart failure.

As reported by other study [18] heart failure subsequent to MI in rats is correlated to a decrease in antioxidant enzyme activities as well as an increase in oxidative stress. The present study showed that a depressed left ventricular function in the MI rats was also associated with a decrease in the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx, and demonstrated that ISP diet has improved antioxidant enzymatic activity when compared with casein diet. SOD and CAT activities were higher in ISP group than casein, in both infarct sizes. These data clearly revealed that an increase in myocardial antioxidants helps to sustain cardiac function subsequent to MI, thus suggesting that a decrease in antioxidant reserve may be a causative factor. The depressed cardiac function was associated with an increase in oxidative damage, as shown by a significant positive correlation between CL and LVEDP and carbonyl groups, as well as an inverse correlation between LVEDP and catalase activity in casein infarcted groups. These data are in accordance with other studies that emphasize the augmented ROS production during MI, leading to oxidative damage to myocardial lipids and proteins. It is important to highlight that lipid peroxidation is correlated to the elevation in LVEDP only in casein fed rats. When ISP was included in the diet this correlation was not seen.

Another noteworthy result is the reduction in oxidative stress observed in uninfarcted rats fed with ISP as compared to casein. This result reinforces the preventive role of ISP against oxidative stress and its prescription to healthy subjects.

Thus, this study demonstrates, for the first time, an improvement in ventricular function after MI avoiding the progression to a severe heart failure stage through ISP administration. The overall results confirm the preventive role of soy-derived products in terms of post-MI myocardial dysfunction probably by an antioxidant action.

Grants

CNPq and FAPERGS, Brazilian Research Agencies supported this work. We would like to acknowledge the Bunge Alimentos (now The Solae Company) - Brazil for the support.

References

1. World Health Organization. Atlas of Heart Disease and Stroke, Sept. 2004. Available at: www.worldheart.org. Accessed November 14, 2005.
2. Erdman JWJ. Soy protein and cardiovascular disease – A Statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the AHA. *Circulation* 2000;102:2555-2559.
3. Zhang X, Shu XO, Gao Y-T, Yang G, Li Q, Li H et al. W. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J Nutr* 2003;133: 2874-2878.
4. Zhan S, Ho SC. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr* 2005;81:397-408.
5. Wagner JD, Zhang L, Greaves KA, Shadoan MK, Schwenke DC. Soy protein reduces the arterial low-density lipoprotein (LDL) concentration and delivery of LDL cholesterol to the arteries of diabetic and nondiabetic male cynomolgus monkeys. *Metabolism* 2000;49:1188-1196.
6. Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, Connelly PW, Parker T, Faulkner D et al. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr* 2002;76:365-372.
7. Tikkanen MJ, Wähälä K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(6):3106-3110.
8. Walker HA, Dean TS, Sanders TA, Jackson G, Ritter JM, Chowienzyk PJ. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilatation of human forearm vasculature with similar potency to 17 β -estradiol. *Circulation* 2001;103:258-262.
9. Wilcox JN, Blumenthal BF. Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *J Nutr* 1995;125(3):631S-638S.
10. Tonstad S, Smerud K, Hoie L. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2002;76:78-84.

11. ADA. Position of The American Dietetic Association: Functional Foods. *J Am Diet Assoc* 1999;99(10):1278-1285.
12. Nagata C, Takatsuko N, Kurizu Y, Shimizu H. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *J Nutr* 1998;128:209-213.
13. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Rad Res* 1997;26:63-70.
14. Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:133-141.
15. Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and anti-promotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Experim Biol* 1995;208:124-130.
16. Singal PK, Khaper N, Farahmand F, Bello-Klein A. Oxidative stress in congestive heart failure. *Cur Cardiol Rep* 2000;2:206-211.
17. Khaper N, Kaur K, Li T, Farahmand F, Singal PK. Antioxidant enzyme gene expression in congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2003;251:9-15.
18. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1996;148(1):291-300.
19. Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial Infarction in mice. *Circulation* 2004;109:544-549.
20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-1951.
21. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503-512.
22. Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassalo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Res* 1990;24:748-753.

23. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocr* 1968;40: 527-528.
24. Llesuy, SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice. *Tumori* 1985;7(3): 241-249.
25. Reznick AZ, Packer L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233:357-363.
26. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991;10: 93-100.
27. Marklund S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press, 1985:243-247.
28. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105: 121-126.
29. Flohé L, Gunzler WA. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-121.
30. Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randal R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
31. Dhalla AK, Singal PK. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol* 1994;266:H1280-H1285.
32. Greaves KA, Parks JS, Williams JK, Wagner JD. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr* 1999;129:1585-1592.
33. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985;72:406-412.
34. Shinjo S, Asato L, Arakaki S, Kina T, Kohrin T, Mori M et al. Comparative effect of casein and soybean protein isolate on body fat accumulation in adult rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1992;38:247-253.

35. Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, et al. The Soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 2003;144(8): 3315-3320.
36. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affect lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;75:265-271.
37. Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in post-menopausal women. *J Nutr* 2001;131:1202-1206.
38. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-1172.
39. Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *JACC* 1998;32(5):1454–1459.

Captions to figure:

Figure 1. Effects of 9 weeks diet treatment on oxidative damage in cardiac muscle homogenates from the different groups. A – Oxidative damage on proteins - radical-mediated protein oxidation as indicated by carbonyl groups. B - Oxidative damage on lipids-tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence. Data expressed as mean \pm SD of 8 animals/group. The legends groups are in the Table 2. ^adifferent from SC (P<0.001); ^bdifferent from IC<25% (P<0.001); ^cdifferent from SS (P<0.01); ^ddifferent from IC>25% (P<0.001) and ^edifferent from SS (P<0.001).

Table 1.

Diet Composition

| Ingredients | Casein (g/kg) | Isolated Soy Protein (g/kg) |
|--------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| Casein (86.7% protein)** | 211 | – |
| Isolated soy protein (92% protein)** | – | 206 |
| Cornstarch | 520 | 525 |
| Sucrose | 100 | 100 |
| Soybean Oil | 70 | 70 |
| Fiber | 50 | 50 |
| Mineral mixture (AIN-93G-MX) | 35 | 35 |
| Vitamin mixture (AIN-93-VX) | 10 | 10 |
| L-Metionine | 1.5 | 1.5 |
| Choline bitartrate | 2.5 | 2.5 |
| Tert-Butylhydroquinone (TBHQ) | 0.014 | 0.014 |

Diet compositions were based on AIN-93G diet [20].

Table 2.

Morphometric parameters of the experimental groups after 9 weeks of treatment.

| Parameter | SC | IC<25% | IC>25% | SS | IS<25% | IS>25% |
|--|--------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| Body weight gain (g) | 282 ± 11 | 264 ± 16 | 257 ± 6.6 ^a | 248 ± 11 ^a | 247 ± 5.0 ^a | 232 ± 8.0 ^a |
| Heart weight/ BW (mg/g) | 2.8 ± 0.3 | 3.3 ± 0.33 ^b | 3.3 ± 0.11 ^b | 2.8 ± 0.2 | 2.9 ± 0.13 ^c | 3.4 ± 0.3 ^d |
| Abdominal adipose tissues (g) | 17 ± 1.9 | 15 ± 1.9 ^b | 13 ± 0.7 ^f | 12 ± 1.5 ^f | 9 ± 0.4 ^f | 9 ± 0.6 ^f |
| Interscapular brown adipose tissue (g) | 0.95 ± 0.1 | 0.94 ± 0.09 | 0.87 ± 0.07 | 1.1 ± 0.08 | 0.98 ± 0.06 | 1.0 ± 0.09 |
| Lee Index | 0.29 ± 0.001 | 0.29 ± 0.001 | 0.29 ± 0.001 | 0.29 ± 0.001 | 0.29 ± 0.001 | 0.29 ± 0.001 |
| Lung wet/BW (mg/g) | 6.6 ± 1.3 | 8.2 ± 0.7 ^e | 11.6 ± 2.6 ^f | 6.01 ± 0.6 | 5.9 ± 0.8 ^{c,e} | 6.9 ± 0.6 ^e |
| Liver wet/BW mg/g) | 31.4 ± 2.2 | 36.3 ± 3.2 ^f | 37.7 ± 0.6 ^f | 31.6 ± 1.4 | 32.7 ± 1.2 ^{c,e} | 35.2 ± 1.0 ^g |

Data expressed as mean ± SD of 8 animals/group. BW, Body weight. Abdominal adipose tissues (epididymal, perirenal and mesenteric). SC, sham-operated, fed with casein; IC<25%, infarct size less than 25%, fed with casein; IC>25%, infarct size greater than 25%, fed with casein; SS, sham-operated, fed with ISP; IS<25%, infarct size less than 25%, fed with ISP; and IS>25%, infarct size greater than 25%, fed with ISP.

^adifferent from SC ($P<0.01$); ^bdifferent from SC ($P<0.05$); ^cdifferent from IC<25% ($P<0.05$);

^ddifferent from SS ($P<0.05$); ^edifferent from IC>25% ($P<0.001$); ^fdifferent from SC ($P<0.001$);

^gdifferent from SS ($P<0.01$).

Table 3.

Hemodynamic parameters of the different groups after 9 weeks of diet treatment.

| Parameter | SC | IC<25% | IC>25% | SS | IS<25% | IS>25% |
|-----------------|-------------|--------------------------|---------------------------|-------------|--------------------------|-----------------------------|
| LVSP (mmHg) | 148 ± 7.3 | 116 ± 9.9 ^a | 90 ± 7.8 ^{a,b} | 142 ± 7.5 | 128 ± 7.9 ^{c,f} | 110 ± 4.8 ^{c,d,e} |
| LVEDP (mmHg) | 5.7 ± 0.6 | 15.6 ± 0.5 ^a | 22.0 ± 0.9 ^{a,b} | 5.1 ± 0.5 | 8.7 ± 1.2 ^{c,b} | 16.6 ± 1.2 ^{d,e,k} |
| +dP/dt (mmHg/s) | 7181 ± 687 | 6061 ± 267 ^a | 5611 ± 751 ^{a,b} | 7186 ± 493 | 7013 ± 141 ^g | 6570 ± 276 ^h |
| -dP/dt (mmHg/s) | -5610 ± 254 | -5009 ± 103 ^a | -4693 ± 99 ^{a,f} | -5433 ± 344 | -5253 ± 196 | -5085 ± 125 ^{c,i} |
| MAP (mmHg) | 121 ± 13 | 104 ± 12 ^j | 86 ± 9 ^{a,g} | 122 ± 8 | 106 ± 4 ^{d,h,j} | 96 ± 8 ^k |

Data expressed as mean ± SD of 8 animals/group. The legend groups in Table 2. LVEDP, left ventricular end diastolic pressure; LVSP, left ventricular systolic pressure; ± dPdt, derivative of left ventricular pressure; MAP, mean aortic pressure. ^adifferent from SC ($P < 0.001$); ^bdifferent from IC<25% ($P < 0.001$); ^cdifferent from SS ($P < 0.01$); ^ddifferent from IC>25% ($P < 0.001$); ^edifferent from IS<25% ($P < 0.001$); ^fdifferent from IC<25% ($P < 0.05$); ^gdifferent from IC<25% ($P < 0.01$); ^hdifferent from SS ($P < 0.05$); ⁱdifferent from IC>25% ($P < 0.05$); ^jdifferent from SC ($P < 0.05$); ^kdifferent from SS ($P < 0.001$).

Table 4.

Antioxidant enzyme activities of SOD, CAT and GPx in cardiac muscle homogenates from the different groups after 9 weeks of diet treatment.

| Parameter | SC | IC<25% | IC>25% | SS | IS<25% | IS>25% |
|------------------------|------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| SOD (U/mg prot) | 22.6 ± 3.0 | 13.7 ± 3.1 ^a | 12.8 ± 1.1 ^a | 38.9 ± 3.8 ^a | 26.9 ± 2.4 ^b | 20.6 ± 2.3 ^{c, d} |
| CAT (pmol/mg prot) | 76.6 ± 7.6 | 52.3 ± 6.7 ^a | 37.4 ± 5.7 ^a | 94.7 ± 11.4 ^a | 75.1 ± 4.7 ^b | 51.9 ± 4.0 ^{d, e, f} |
| GPx (nmol/min/mg prot) | 14.6 ± 2.3 | 11.1 ± 1.8 ^a | 7.5 ± 1.7 ^{a, g} | 18.1 ± 1.9 ^a | 12.4 ± 1.2 ^f | 9.4 ± 1.7 ^{f, h} |

Data expressed as mean ± SD of 8 animals/group. The legend groups in Table 2. ^adifferent from SC (P<0.001); ^bdifferent from SS and IC<25% (P<0.001); ^cdifferent from SS and IC>25% (P<0.001); ^ddifferent from IS<25% (P<0.01); ^edifferent from IC>25% (P<0.01); ^fdifferent from SS (P<0.001); ^gdifferent from IC<25% (P<0.01) and ^hdifferent from IS<25% (P<0.05).

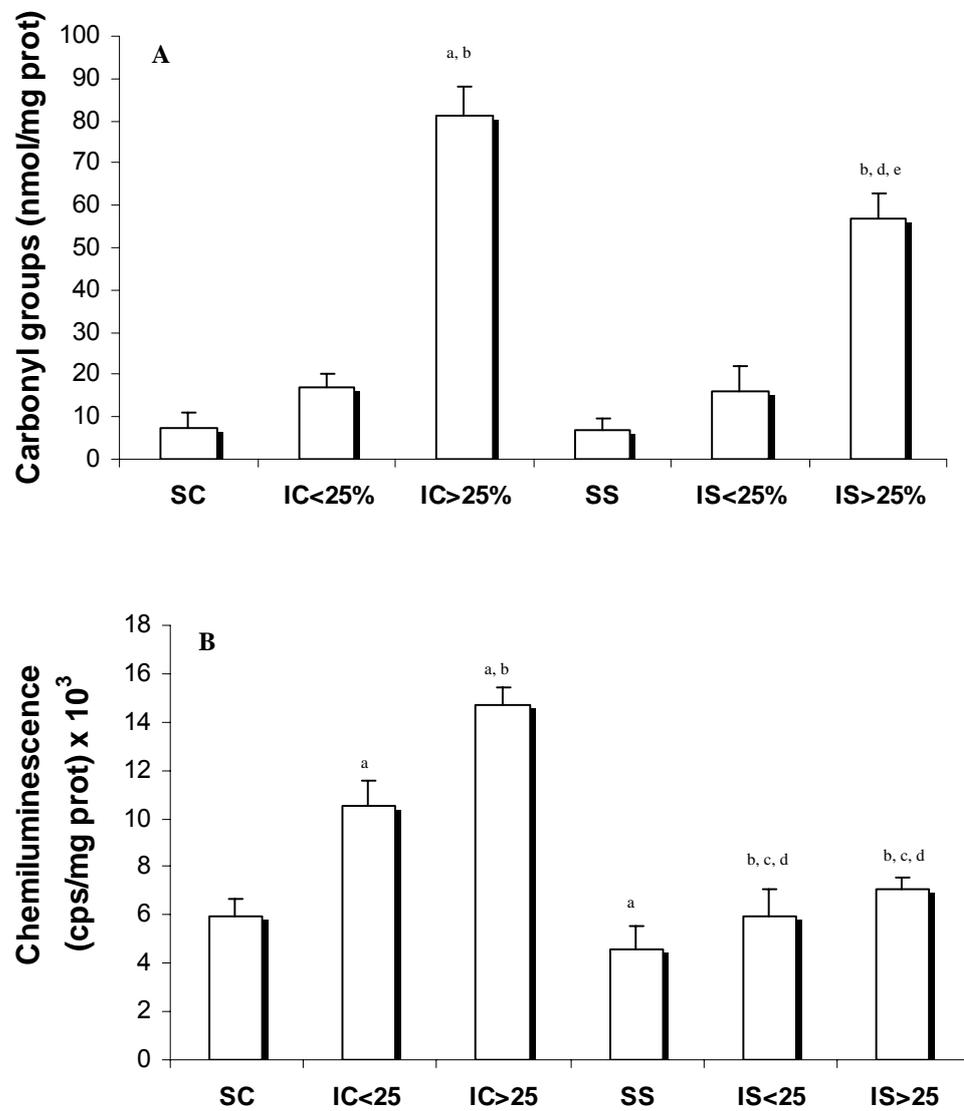


Figure 1

APÊNDICE B

ARTIGO 2

**Antioxidant potential of soy derived products in vitro and in a
myocardial infarct model in vivo**

Antioxidant potential of soy derived products *in vitro* and in a myocardial infarct
model *in vivo*

**Martine Kienzle Hagen^{1,2}, Ana Raquel Lehenbauer¹, Ana Carolina Paludo¹,
Roberta Hack Mendes¹, Joana Dreher Toniolo², Tânia Gatelli Fernandes¹,
Jose Marcos Mandarino³, Susana Llesuy⁴, Adriane Belló-Klein^{1*}**

¹Cardiovascular Physiology Laboratory at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ²Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and ³EMBRAPA – Londrina, Brazil, ⁴Physiology and Pharmacology Department – Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

Running Title: Antioxidant potential of soy products *in vitro* and *in vivo*

Address for Correspondence: Dr. Adriane Belló-Klein

Cardiovascular Physiology Laboratory
Federal University of Rio Grande do Sul
Av. Sarmiento Leite 500
CEP: 90050170
Porto Alegre
BRAZIL
Tel: (51) 3316-3621
Fax: (51) 3316-3656
E-mail:belklein@ufrgs.br

Abstract

The total antioxidant reactivity (TAR) and total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) of the antioxidants were quantified in hypocotyl of soybean (HS) and isolated soy protein (ISP). Inhibition of lipid peroxidation (LPO) by HS and ISP was measured in liver homogenates. In other experiment, an ISP diet was offered during 9 weeks to rats myocardial infarction (MI) divided into 4 groups: Casein; Soy; Infarcted Casein; Infarcted Soy. LPO, antioxidant enzyme activities and nitrites/nitrates were determined in blood. HS has about 3x more TAR than ISP, but both products exhibited same TRAP. Inhibition of LPO by HS and ISP was proportional (81% and 79%, respectively). ISP diet increased antioxidant enzymes and nitrites/nitrates. MI increased LPO (by 155%) and ISP diet reduced it by 30%. The results indicate that the HS and ISP have a good quantity and quality of antioxidants and that the ISP diet increased the antioxidant reserve and reduced oxidative damage induced by MI.

Key words: peripheral markers of oxidative stress; isoflavones; soy derived products; myocardial infarction; antioxidant enzymes; lipid peroxidation.

Introduction

All plant foods have complex mixtures of chemicals including both nutrients and biologically active nonnutrients, referred to as nutraceuticals or phytochemicals. Soy is known for having high concentrations of several physiologically-active phytochemicals, including isoflavones, phytate, saponins, phytosterols and protease inhibitors. Soybean and soy products are a particularly abundant source of isoflavones. They contain approximately 0.2 - 1.6 mg of isoflavones/g dry weight [1].

Isoflavones are a subclass of a large and ubiquitous group of nutraceuticals called flavonoids. The primary isoflavones in soy are genistein (4',5,7-trihydroxy-isoflavone) and daidzein (4',7-dihydroxy-isoflavone), and their respective β -glycosides, genistin and daidzin. There are also small amounts of a third isoflavone in soy, glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) and its glycoside, glycitin [2]. The flavonoids are members of a class of natural compounds that recently has been the subject of considerable scientific and therapeutical interest. One of the most useful properties of many flavonoids is their ability to scavenge free radicals [3].

Previous works have indicated that isoflavones exhibit free radical-scavenging action [4], may increase the activity of antioxidant enzymes [5]. It has also been recently demonstrated that genistein and daidzein at physiologically achievable levels elevate significantly the concentrations of glutathione in human endothelial cells [6].

Free radicals have been implicated in the pathophysiology of a large number of diseases and this role has been attributed to their high reactivity and deleterious effects on cell structures. Because of their high reactivity, they may

interact with biomolecules, inducing oxidative injury. Flavonoids, such as isoflavones, are excellent agents to maintain the oxidative stress under control, but they have to be taken regularly and in considerable amounts due to their short half-lives in the body (1-2hr) [7].

Of great interest is the study of cardioprotection because of the high incidence and prevalence of coronary heart disease [8] and heart failure is the major cause of mortality in Western countries. The progress made in our understanding of the pathophysiology and treatment of congestive heart failure would not have been possible without using a number of animal models of heart failure. These experimental models are required to better understand the progression of the disease and elaborate new therapies [9].

Many studies have highlighted the role of oxidative stress in heart failure pathogenesis [10]. We can access oxidative stress by measuring some peripheral markers in the systemic blood, which reflect the balance of reactive oxygen species (ROS) production and the antioxidant reserve in the different tissues [11]. In this way, oxidative stress evaluation in erythrocytes using standardized methods can be useful to assess this complex phenomenon in experimental models as well as in a clinical situation.

Thus, the aim of this work was to analyze the content of isoflavones in two different soy derived products, evaluating its quantity and quality of antioxidants, and to test the effectiveness of these products in scavenging ROS derived from an in vitro free radical generating system.

It was also our objective to verify if a soybean enriched diet offered to rats could, by increasing the antioxidant reserve of the erythrocytes, protect them against oxidative stress induced by myocardial infarction in vivo.

Materials and Methods

Isoflavones analysis. Isoflavones were extracted from 100 mg of the samples - milled roasted hypocotyl (germ) of soybean (HS) and isolated soy protein (ISP). Samples were placed in test tubes with 4.0 mL of 70 % aqueous ethanol solution containing 0.1 % acetic acid, at room temperature for 5 hours; test tubes were shaken, every 15 minutes. After extraction, the extracts were stored in a freezer to proceed the HPLC analysis. For the HPLC analysis, the samples were centrifuged for 10 min at 13,500 rpm, at 10 °C. After centrifugation, 80 µL of the supernatant were transferred to the microtubes of the HPLC apparatus auto sampler racks. The volume injected was 10 µL. Isoflavones analysis was performed on ODS C-18 column (YMC-Pack ODS-AM), 5 micron particle size, 120 Å (250 x 4.6 mm I.D.) with a Metaguard guard column. The mobile phase solvent A was a solution of acetonitrile and 0.1 % (w/v) acetic acid, while solvent B was a solution of water and 0.1 % acetic acid. Initial gradient was 20 % for the solvent A and 80 % solvent B at flow rate of 1 mL per min, then developed with a linear gradient to 50% solvent A in 20 min and 100 % for next 5 min, and returning to the initial 20 % for the last 15 min. The complete elution of each sample was performed in 40 min. The wavelength monitored and used for peaks integration was 260 nm. Isoflavone peaks were identified by their spectra and retention time. Standard curves were prepared with pure isoflavone standards (0.0125 mg/mL) of daidzin, daidzein, genistin and genistein (Sigma - St. Louis, MO, USA) and molar extinction coefficients obtained from these curves were used to determine the levels of all forms of the isoflavones in the HS and ISP used in this study [12]. Protein was measured by the Kjeldahl method [13].

Total antioxidant reactivity (TAR) assay. The TAR assay is based on luminol-enhanced chemiluminescence (CL) induced by an initiator 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP). CL was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB – Produkter AB, Sweden). The assay conditions were as described before [14]. TAR values were expressed as equivalents of Trolox concentration per milligram of protein. It was analyzed the TAR of HS and ISP in the final concentration: 2 % w/v.

Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP). The total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) represents the total antioxidant capacity of the soy product and was determined by measuring the luminol CL intensity induced by ABAP [14]. The results were represented as nmol/L Trolox/mg protein. It was analyzed the TRAP of HS and ISP in the following final concentrations: 2 % w/v.

Inhibition of thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS) formation. Rat liver homogenates were incubated at 37 °C for 15 min in the presence of HS and, ISP; controls were incubated with medium only (in 10 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 7.6). The final concentrations of each substance in the incubation medium were 2 %. After incubation, it was added the free radicals generator system with 0.5 mmol/L 30 % of H₂O₂, 1.0 mmol/L ascorbic acid and 0.02mmol/L ferrous sulfate [15] and were incubated at 37 °C for 30 min. Aliquots were taken to measure TBARS. Results are mean ± S.D.M. of 6 experiments performed in duplicate.

For the TBARS assay, trichloroacetic acid (10 % w/v) was added to the homogenate, and this mixture was then centrifuged (1000 g, 3 min) [16]. The protein-free sample was extracted and thiobarbituric acid (0.67 % w/v) was

added to the reaction medium and incubated at 100°C for 15 min. Absorbency was read at 535 nm in a spectrophotometer. Commercially available malondialdehyde was used as a standard. Results were expressed as % of inhibition of TBARS formation.

Chemicals and components of the diets. Casein was purchased from Farmaquímica, Porto Alegre, Brazil. Isolated soy protein (ISP – Samprosoy 90LH) and soybean oil were obtained gratis from Bunge Alimentos (now The Solae Company, Esteio, Brazil). Mineral mixture and vitamin mixture were obtained gratis from Roche Ltd., fiber from Colorcon do Brazil and Choline bitartrate from Valdequímica Produtos Químicos Ltda, Porto Alegre, Brazil. L-methionine was purchased from Merck, Rio de Janeiro, Brazil. Tert-Butylhydroquinone (TBHQ) was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). All other compounds were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Animals and experimental groups. The experimental protocol was reviewed and approved by the Ethical Committee of Federal University of Rio Grande do Sul. Twenty-one-day-old male Wistar rats were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Rio Grande do Sul. Animals were housed in metabolic cages (one animal each), received water and food ad libitum and were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 hours light/dark cycle). All animals were fed with the experimental diets for nine weeks, from the 3rd to the 12th weeks of life, and were weighed weekly throughout the study.

Animals were assigned into four groups: (1) Sham Casein (SC), sham-operated, fed with casein; (2) Sham Soy (SS), sham-operated, fed with ISP; (3) Infarct Casein (IC), infarcted, fed with casein; (4) Infarct Soy (IS), infarcted, fed with ISP.

Diet. Diets compositions were formulated according to the specifications of the AIN-93G [17] and contained similar amounts of protein, fat, carbohydrates, minerals, and vitamin, except for the protein source: casein or ISP (Table 1). Food intake was measured three times a week, along the 9-week experimental period. The mean daily intake of the SC group was 21 g while it was 18 g/day in the SS group. Considering mean values of food intake along the treatment, the animals under ISP diet received 7 mg all forms isoflavones/day which is 5 mg in aglycone equivalents.

Myocardial infarction induction and infarct size determination. Five weeks after the beginning of diet treatment, myocardial infarction was produced by occlusion of the left coronary artery according to a technique described previously [18, 19]. A sham-operation was performed in the control groups in which all surgical procedures were performed except that the suture around coronary artery was not tied. The presence of infarction was easily confirmed by gross visualization of the fibrous scar on the anterolateral region of the left ventricle after sacrifice by decapitation. The scar tissue and the remaining left ventricular myocardium were blotted and weighed, and their outlines were drawn on graph paper to estimate the respective areas. Infarct size was calculated and reported as percent of the ventricular endocardial surface covered with scar tissue [19].

Blood samples preparation. Immediately before the sacrifice, blood samples were collected by cardiac puncture (2 mL in heparinized tubes). The samples were centrifuged for 10 minutes at 1000 g (Sorval RC 5b-rotor SM 24, Du Pont Instruments, USA), and the plasma was separated for further assays of nitrites and nitrates. Afterwards, the erythrocytes were washed out with a saline solution (NaCl 0.9%), and used for further assays of oxidative stress. After blood collection, animals were killed by decapitation.

Peripheral markers of oxidative stress. In order to evaluate lipid peroxidation (LPO), tert-butyl hydroperoxide (tBOOH)-initiated chemiluminescence (CL) technique was analyzed in the red blood cells. CL was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB – Produkter AB, Sweden) as described before [20]. Data were expressed as counts per second per milligram of the blood sample hemoglobin (Hb) (cps/mg Hb). Antioxidant enzyme activities were also determined. Superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as units per milligram of protein, was based on the inhibition of the superoxide radical reaction with pyrogallol. Absorbance changes were measured at 420 nm for 2 min [21]. Catalase (CAT) activity was determined by following the decrease in 240-nm absorption and expressed as picomol of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein [22]. Glutathione peroxidase (GPx) activity expressed as nanomols of peroxide/ hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein, was measured by following NADPH oxidation at 340 nm as described by Flohé and Gunzler [23].

Nitrites and nitrates. Total plasmatic nitrites and nitrates concentration were determined according to the method of Granger et al., 1999 [24]. The plasma samples were incubated with enzymatic cofactors and nitrate reductase (1.75 U/mL) for 30 minutes at room temperature to convert nitrite to nitrate. Adding Griess reagent (1 g sulfanilamine, 0.1 g de naftiletlenodiamine, 2.3 mL de ortofosforic acid 85%, and 97.7 mL water) to the reaction medium evoked the reaction. The reaction medium consisted of: Tris 1 mol/L, pH 7.5; NADPH 0.02 mmol/L; glucose-6-phosphate 5mmol/L; glucose-6-phosphate-dehydrogenase 10 U/mL e nitrate reductase 0.1 U/mL. Absorbency was read at 540 nm in a spectrophotometer and the results were expressed as µmol/L.

Protein and hemoglobin determination. Protein was measured by the method of Lowry et al., using bovine serum albumin as the standard [25]. The hemoglobin determination was assessed by the conversion of hemoglobin to cyanomethaemoglobin by the Drabkin reagent measured against a standard curve [26].

Statistical analysis. Data were expressed as mean \pm standard deviation of the mean (S.D.M.) and were compared by one-way analysis of variance. The Student-Newman-Keuls post hoc test was used to determine significant differences among individual groups. The Graphpad InStat 3.0 software (San Diego, California – USA) was used. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Table 2 shows the content of isoflavones in HS and ISP analyzed by HPLC. The HS showed higher amount of total isoflavones content and higher content of daidzin (9x more), genistin and mal-daidzin than ISP. However, ISP demonstrated higher amounts of genistein (4.5x more), and mal-genistin (4.5x more) than HS.

We tested the in vitro effect of the two soy products at 2 % w/v concentration in the total antioxidant reactivity (TAR) assay, which is based on luminol-enhanced CL induced by an ABAP initiator. Comparing the two products in terms of TAR, it was observed that HS has about 3 times more antioxidant reactivity as compared to ISP. However, the two soybean derived products presented the same TRAP, which means that the total amount of antioxidant is similar in both products (Figure 1 A and B).

In the following experiment, a significant concentration of free radicals, especially hydroxyl radical, was produced by means an in vitro free radicals generator system, which induces the Fenton reaction in rat liver homogenates. The resulting LPO was quantified by means of TBARS method. In this reaction medium, it was added the HS or the ISP (2 % w/v) at physiological condition, promoting a inhibition in the LPO (Figure 2). The control value was 5.95 μmol

MDA/ mg protein. The two products were able to inhibit the TBARS formation in the same proportion (by 81 % and 79 % for HS and ISP, respectively).

In Table 3, it was evaluated the systemic oxidative profile of rats treated with ISP or casein diet. It was determined erythrocytes CL, SOD, CAT, and GPx. In the ISP fed rats, the three antioxidant enzymes were found to be increased (by 49%, 142%, and 11% for SOD, CAT, and GPx respectively) while CL has been slightly reduced but not significantly as compared to casein diet. In plasma, the nitrite and nitrate levels were significantly increased (by 86%, and 50%, respectively) in ISP fed rats.

Since we have demonstrated the importance of ISP diet administration to healthy animals, we decided to study the antioxidant effect in a cardiovascular disease model.

Thus, we offered an ISP diet to rats submitted to myocardial infarction and we have studied plasma and erythrocytes oxidative stress at four weeks after surgery. Rats in the infarcted groups have shown an infarct size area of about 36% of the left ventricle mass (data not shown). Table 3 shows an increased LPO in the infarcted animals treated with casein (IC) as compared to SC. However, when ISP was administered, it was observed a reduction by 30 % ($p < 0.05$) in CL in the IS as compared to IC group.

In the Table 3, it can be also observed that myocardial infarction induced a reduction of antioxidant enzyme activities. In the infarcted group treated with casein (IC), antioxidant enzymes were reduced by 35%, 75%, and 22% for SOD, CAT, and GPx, respectively. In the group treated with ISP diet (IS), this reduction was not so pronounced (26%, 67%, and 18% for SOD, CAT, and GPx, respectively).

We have evaluated the role of NO, through the measurement of its metabolites (nitrates and nitrites) in plasma (Table 3). It was observed a great

decrease (by 86%) in plasmatic content of nitrites and nitrates in the infarcted rats fed with casein. This reduction was attenuated in the ISP diet rats, being about 78% less than the control (SS). By the same way that it was observed in enzymatic activity, nitrite and nitrate content was also increased (by about 68%) in noninfarcted animals receiving ISP diet (SS) as compared to SC.

Discussion

Many studies have demonstrated the potential benefit of soybean derived products consumption in the diet, associating their effects to the presence of antioxidants [27].

Our intention in this study was to test if soy derived products could exhibit in vitro and in vivo antioxidant activity.

To a correct interpretation of data, it was necessary to analyze first the in vitro antioxidant capacity of the soybean products to be used in this study. For this reason, we used three different methods: the total radical trapping antioxidant potential (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR) and the inhibition of lipid peroxidation in rat liver homogenates.

To define the quality of the antioxidants present in the soy derived products, it was performed TAR technique. In this study, we observed that HS has greater TAR values than ISP. When the chemical analysis of the products was performed, it was seen that they present the same flavonoids but in different concentrations. HS has greater amounts of the glycoside isoflavones (especially daidzin) whereas in ISP daidzein and genistein are the main aglycone isoflavones [28]. These differences justify the distinct antioxidant reactivity of these compounds.

TRAP evaluation of the two compounds revealed that both products have similar levels, which means that they may scavenge the same quantity of free radicals.

To test if the antioxidants present in the soy derived products could interact in a biological system, it was analyzed the percentage of inhibition of lipid peroxidation. Lipid peroxidation was generated by the addition of hydrogen peroxide, ascorbic acid and ferrous sulfate that produces oxidative damage to the liver membrane lipids. ISP or HS addition to this incubation medium was able to reduce the lipid peroxidation products. Both products exhibited similar percentage of LPO inhibition, indicating that these products have a good activity as free radical scavengers in a biological system.

As observed from the *in vitro* studies, ISP has a good antioxidant capacity (besides of having less antioxidant reactivity than HS). However, ISP bioavailability is higher than HS, since it has more aglycone isoflavones. Setchel et al., 2002 [29] demonstrated that isoflavone glycosides are not absorbed directly unless they are hydrolyzed by the intestine enzymes or microbial enzymes. Izumi et al., 2000 [30] found that aglycones were absorbed faster and in greater amounts than glycosides forms.

Thus, we decided to use ISP administered in diet to rats in an attempt to demonstrate its possible protecting role *in vivo*.

Systemic oxidative stress biomarkers analysis demonstrated that ISP fed rats have shown amelioration in all the parameters analyzed. It is interesting to note the great increase in the erythrocytes antioxidant enzyme activities of SOD and CAT. This coincides with other reports in literature using isolated isoflavones in diet [31]. Oxidative damage to erythrocytes membrane lipids, evaluated by CL, was not altered significantly when ISP diet was administered. Nitric oxide (NO) metabolites (nitrite and nitrate) levels were also analyzed in the plasma of the animals fed with casein or ISP diet. It was observed an increase in NO, suggesting higher NO plasmatic concentration in ISP fed rats than in controls.

Actually, it was seen an increase in endothelial NO synthase (eNOS) expression when genistein was offered in diet [32].

In our study, when rats were submitted to a chronic oxidative challenge by means a coronary artery ligation, producing myocardial infarction, it was noted an evident increase in lipid peroxidation estimated by CL. However, in the animals that received ISP diet, CL was significantly reduced as compared to their respective controls. Myocardial infarction produces a great elevation in ROS production [33]. The ISP diet administration, which contains many phenolic compounds capable to scavenge ROS (responsible for CL generation) was able to reduce erythrocytes CL.

It is also remarkable that, in face of the oxidative stress imposed by myocardial infarction, the ISP fed rats have more antioxidant enzyme protection than those treated with casein.

Considering that myocardial infarction generates a great amount of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and that its detoxifying enzyme SOD has its activity more preserved in the ISP fed rats, it would be reasonable to think that part of the toxic effect of $O_2^{\bullet-}$ would be neutralized in these animals.

H_2O_2 formed in the dismutation reaction of $O_2^{\bullet-}$ would be rapidly consumed by CAT, enzyme that has been increased about 100% its activity in the healthy animals that consumed ISP diet (SS). When oxidative stress is installed by myocardial infarction induction, animals that received ISP diet are probably more adapted than their controls, since CAT activity is significantly enhanced. If CAT is elevated, it will eliminate the H_2O_2 formed in the oxidative process. H_2O_2 may diffuse from the myocardial infarcted area to the blood and it would be the main prooxidant in erythrocytes and the agent of damage in these cells.

The third antioxidant enzyme studied (GPx) also shown a similar profile of oscillation than the other two, but not so expressive.

In terms of plasmatic NO metabolites, we have seen a significant decrease in these parameters not only in the casein treated animals submitted to myocardial infarction but also in the ISP ones. However, this reduction was not so marked in the ISP fed rats. As cited before, the increased ROS production in MI [33] summed to elevated NO levels, would yields to the production of peroxynitrite (ONOO⁻), a very strong oxidant. In the ISP treated animals, since SOD activity is higher than in controls, O₂^{•-} levels in erythrocytes would be less, generating less ONOO⁻. This could promote a greater NO bioavailability, attenuating the cardiac remodeling and apoptosis after myocardial infarction, as demonstrated by Smith et al., 2005 [34]. The aspects of cardiac remodeling were not the focus of this paper.

Conclusion

In conclusion, the data presented in this paper allow to estimate the importance of soybean derived products consumption to healthy subjects since these products are able to increase the antioxidant reserve in blood. The *in vitro* and *in vivo* effects of soy derived products observed in this study are related to their antioxidant ability, making them promising substances to be investigated as water-soluble protectors against lipid peroxidation and other free radical-mediated cell injuries.

GRANTS

This work was supported by CNPq and FAPERGS, Brazilian Research Agencies. We would like to acknowledge the Bunge Alimentos (now The Solae Company) - Brazil for the support.

References

- [1]Ren MQ, Kuhn G, Wegner J, Chen J. Isoflavones, substances with multi-biological properties. *Eur J Nutr* 2001; 40:135-146.
- [2]Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol and Therap* 2002; 96:67-202.
- [3]Ubeda A, Esteve ML, Alcaraz MJ, Cheeseman KH, Slater TF. Effects of flavonoids on cytochrome P450 from rat liver microsomes: inhibition of enzyme activities and protection against peroxidative damage. *Phytother Res* 1995; 9:416-420.
- [4]Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-Usmar V. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Rad Biol Med* 2001; 31(12):1570-1581.
- [5]Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, and Rice-Evans CA. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Rad Res* 1997; 26:63-70.
- [8]Guo Q, Rimbach G, Moini H, Weber S, and Packer L. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* 2002; 179:171-180.
- [7]Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:285-294.
- [8]World Health Organization. Atlas of Heart Disease and Stroke, Sept. 2004. Available at: www.worldheart.org. Accessed November 14, 2005.
- [9]Monnet E, Chachques, JC. Animal Models of Heart Failure: What Is New? *Ann Thorac Surg* 2005; 79:1445–53.

- [10]McCarty AP, Shah MA. Oxidative stress and heart failure. *Cor Artery Dis* 2003; 14(2):1-5.
- [11]Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llessuy S. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:643-49.
- [12]Berhow MA. Modern analytical techniques for flavonoids determination. In: Buslig BS, Manthey JA, editors. *Flavonoids in the living cell*. New York: Klusher Academic; 2000. pp.61-76.
- [13]Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3th ed. São Paulo; 1985. v. 1.
- [14]Siqueira IR, Fochesatto C, Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A, Netto CA. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:153-158.
- [15]Halliwell B, Gutteridge, JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Meth Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- [16]Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1978; 52:302-310.
- [17]Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.
- [18]Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, and Finn P. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44:503-512.

- [19] Mill JG, Stefanon I, Leite CM, and Vassalo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Res* 1990; 24:748-753.
- [20] Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991; 10:93-100.
- [21] Marklund S. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press; 1985. pp. 243-47.
- [22] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
- [23] Flohé L, Gunzler WA. Assay of Glutathione Peroxidase. *Meth Enzymol* 1984; 105:114-121.
- [24] Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Meth Enzymol* 1999; 301: 58-61.
- [25] Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, and Randal R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
- [26] Drabkin DL, Austin J. Spectrophotometric studies: Preparation from washed blood cells, nitric oxide hemoglobin and sulfahaemoglobin. *J Biol Chem* 1935; 112:51-57.
- [27] Liu J, Chang SKC, Wiesenborn D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and vivo. *J Agric Food Chem* 2005; 53:2333-2340.
- [28] Kruk I, Aboul-Enein HY, Michalska T, Lichszteid K, Kladna A. Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 2005; 20:81-89.

- [29]Setchell KDR, Brown NM, Zinner-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirshner AS, Heubi JE. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:447-453.
- [30] Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. Soy isoflavones are absorbed faster and in higher amounts than their glycosides in humans. *J Nutr* 2000; 130:1695-1699.
- [31]Röhrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE. *J Nutr* 2002; 132:370-375.
- [32]Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, Ferlito M, Campo GM, Bova A, Caputi A. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovascular Research* 2000; 45:454-462.
- [33]Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, and Takeshita A. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 86:152-157, 2000.
- [34] Smith Jr RS, Agata J, Xia CF, Chao L, Chao J. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. *Life Sciences* 2005; 76:2457-2471.

Captions to figures:

Figure 1. **A** - Total antioxidant reactivity (TAR) levels of Hypocotyl of Soybean (HS) and Isolated Soy Protein (ISP). Results are mean \pm S.D.M. of experiments performed in triplicate. TAR is calculated as pmol eq. of Trolox per mg protein. * $p < 0.01$. **B** - Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). Results are mean \pm S.D.M. of experiments performed in triplicate. TRAP is calculated as nmol of Trolox per mg protein.

Figure 2. Thiobarbituric acid reactive substances method (TBA-RS) of Hypocotyl of Soybean (HS) and Isolated Soy Protein (ISP) expressed as percentage of inhibition of malondialdehyde. Results are mean \pm S.D.M. of 6 animals/group. TBARS is calculated as μmol of malondialdehyde per mg protein.

Table 1
Diets Composition

| Ingredients | Casein g/kg | Isolated Soy Protein g/kg |
|--------------------------------------|----------------|------------------------------|
| Casein (86.7% protein)** | 211 | – |
| Isolated soy protein (92% protein)** | – | 206 |
| Cornstarch | 520 | 525 |
| Sucrose | 100 | 100 |
| Soybean Oil | 70 | 70 |
| Fiber | 50 | 50 |
| Mineral mixture (AIN-93G-MX) | 35 | 35 |
| Vitamin mixture (AIN-93-VX) | 10 | 10 |
| L-Metionine | 1.5 | 1.5 |
| Choline bitartrate | 2.5 | 2.5 |
| Tert-Butylhydroquinone(TBHQ) | 0.014 | 0.014 |

Diet compositions were measured in grams per kilograms, based on AIN-93G diet (Reeves et al, 1993). **Content analysis was performed at Physical Chemistry Laboratory of the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Paraná, Brazil.

Table 2

Content of isoflavones (in mg/ 100g of the product) in hypocotyl of soybean and isolated soy protein

| Isoflavones | Product Isoflavones Content (mg/ 100g product) | |
|--------------|---|----------------------|
| | Hypocotyl of soybean | Isolated Soy Protein |
| Daidzein | 21.8 | 24.4 |
| Genistein | 5.2 | 23.2 |
| Daidzin | 186.5 | 19.7 |
| Genistin | 63.2 | 34.1 |
| Mal-Daidzin | 52.7 | 21.4 |
| Mal-Genistin | 14.6 | 66.2 |
| TOTAL | 344 | 189 |

Content analysis was performed at Physical Chemistry Laboratory of the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Paraná, Brazil. Was reported as 189mg all forms/100g of ISP, which is 126mg/100g of ISP in Aglycone Equivalents

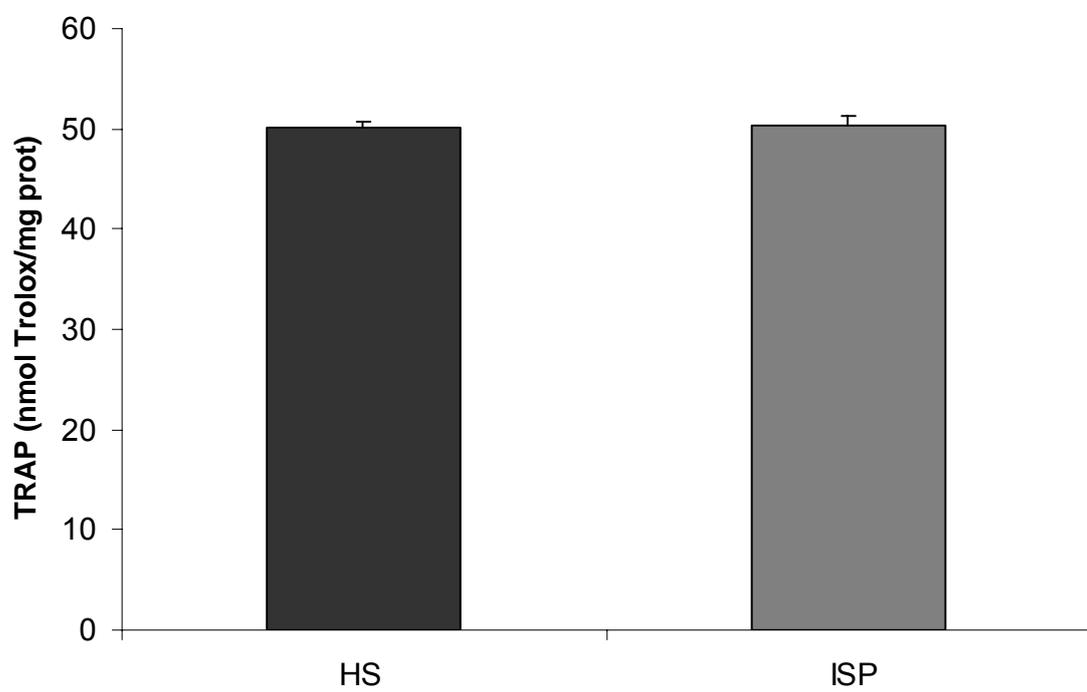
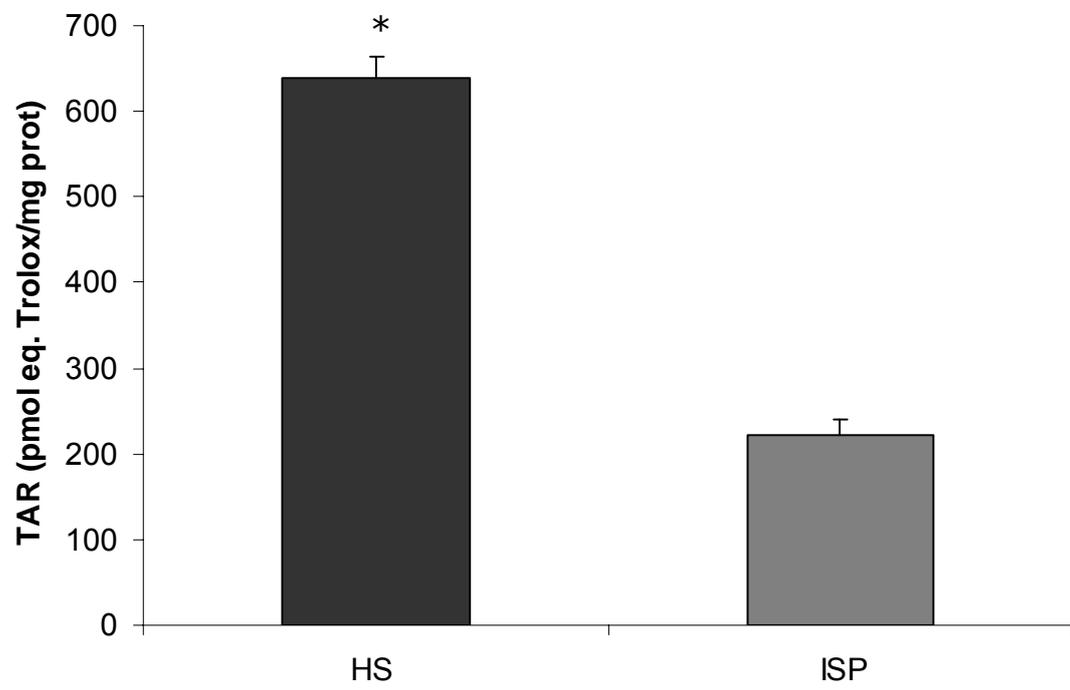


Figure 1.

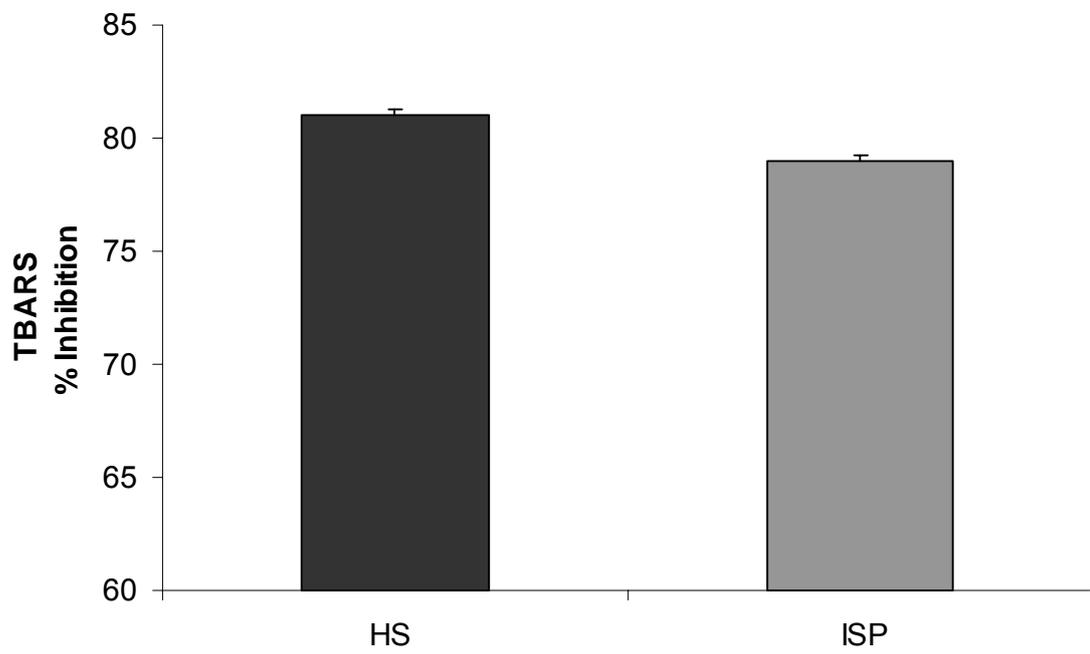


Figure 2.

Table 3.

Effects of 9 weeks diet treatment on plasma and erythrocytes antioxidant parameters in the different experimental groups

| Parameter | SC | SS | IC | <i>IS</i> |
|---------------------------------|-----------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <u>Erythrocytes</u> | | | | |
| CL (cps/mg Hb) x10 ³ | 9,50±0,9 | 8,10±0,8 | 24,2±1,7 ^a | 18,2±1,9 ^{b,e} |
| SOD (U/mg prot) | 7.8±1.1 | 11.6±1.3 ^d | 5.1±0.9 ^a | 8.6±0.8 ^{c,f} |
| CAT (pmol/mg prot) | 2.4±0.3 | 5.8±0.5 ^a | 0.6±0.1 ^a | 1.9±0.3 ^b |
| GPx (nmol/min/mg prot) | 7.0±0.5 | 7.8±0.5 ^d | 5.6±0.6 ^d | 6.4±0.6 ^f |
| <u>Plasma</u> | | | | |
| [Nitrite] (µM) | 0.14±0.01 | 0.26±0.01 ^a | 0.02±0.003 ^a | 0.06±0.002 ^{a,b,e} |
| [Nitrate] (µM) | 1.03±0.04 | 1.55±0.05 ^a | 0.14±0.02 ^a | 0.32±0.02 ^{a,b,e} |

Data expressed as mean ± SD of 8 animals/group. Sham Casein (SC), sham-operated, fed with casein; Sham Soy (SS), sham-operated, fed with ISP; Infarct Casein (IC), infarcted, fed with casein; Infarct Soy (IS), infarcted, fed with ISP. ^adifferent from SC (P<0.001); ^bdifferent from SS (P<0.001); ^cdifferent from IC (P<0.001); ^ddifferent from SC (P<0.01); ^edifferent from IC (P<0.05); ^fdifferent from SS (P<0.01).

ANEXO 1

Análise de Proteínas



Área de Genética e Melhoramento
Laboratório de Análises Físico-Químicas

Resultado de Análises

Solicitante: Martine Elisabeth K. Hagen

Projeto: 04.2000.321.02

Responsável: Marcelo Apº da Silva

Data: 05 /02/2002

| Nº Lab. | Amostras | % Proteína | % Óleo |
|---------|---|------------|--------|
| 56 | Proteína isolada de soja Samprosoy 90 LH | 92,22 | # |
| 57 | Hipocótilo de soja | 42,65 | # |
| 57 | Caseína | 86,7 | # |

Técnicas utilizadas nas análises: Kjeldahl (proteína) e Gravimétrico (umidade)
Resultados expressos em base seca

ANEXO 2

Análise de Isoflavonas



Área de Genética e Melhoramento
Laboratório de Análises Físico-Químicas

Resultado de Análises

Data: 05/02/2002

Responsável: Aline Silva Simão

Solicitante: Martine Elisabeth Kienzle Hagen

DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS

Hipocótilo de Soja

| | DAIDZINA | GENISTINA | MAL-DAIDZINA | MAL-GENISTINA | DAIDZEINA | GENISTEÍNA | TOTAL |
|--------------|----------|-----------|--------------|---------------|-----------|------------|--------|
| Repetição 1 | 188,60 | 63,19 | 52,91 | 14,41 | 21,76 | 5,20 | |
| Repetição 2 | 184,34 | 63,17 | 52,57 | 14,74 | 21,86 | 5,21 | |
| MÉDIA | 186,47 | 63,18 | 52,74 | 14,58 | 21,81 | 5,21 | 343,98 |

Proteína Isolada de Soja

Samprosoy 90 LH

| | DAIDZINA | GENISTINA | MAL-DAIDZINA | MAL-GENISTINA | DAIDZEINA | GENISTEÍNA | TOTAL |
|--------------|----------|-----------|--------------|---------------|-----------|------------|--------|
| Repetição 1 | 19,93 | 37,54 | 21,47 | 66,10 | 25,43 | 25,34 | |
| Repetição 2 | 19,49 | 30,68 | 21,43 | 66,28 | 23,36 | 21,09 | |
| MÉDIA | 19,71 | 34,11 | 21,45 | 66,19 | 24,40 | 23,22 | 189,07 |

*Dados em mg por 100 gramas.

ANEXO 3

Cálculo de Equivalentes de Isoflavonas Agliconas

The Solae Company

Unadjusted isoflavone values for Samprosoy 90LH ISP were provided by Martine Kienzle Hagen⁽¹⁾

| Isoflavone Profile | Unadjusted Isoflavones | Correction Factor | Aglycone Equivalent |
|------------------------|------------------------|-------------------|---------------------|
| | mg/100g product | | mg/100g product |
| *Genistin | 34,1 | 0,625 | 21,3 |
| 6"-OMal-Gen. | 66,2 | 0,521 | 34,5 |
| 6"-OAc-Gen. | not reported | 0,57 | |
| *Genistein | 23,2 | 1 | 23,2 |
| Total Genistein | 123,5 | | 79,0 |
| *Daidzin | 19,7 | 0,611 | 12,0 |
| 6"-OMal-Daid. | 21,4 | 0,506 | 10,8 |
| 6"-OAc-Daid. | not reported | 0,555 | |
| *Daidzein | 24,4 | 1 | 24,4 |
| Total Daidzein | 65,5 | | 47,3 |
| Glycitin | not reported | 0,637 | |
| 6"-OMal-Gly | not reported | 0,534 | |
| Glycitein | not reported | 1 | |
| Total Glycitein | | | |
| TOTALS | 189 | | 126 |

⁽¹⁾ Cardiovascular Physiology Laboratory at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RGS, Brazil.
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RGS, Brazil

Conversion factors were provided so that researcher could convert conjugated isoflavone values to their aglycone equivalents.

GH 1/19/06

Glenna Hughes, M.S.

Lead, Clinical Products

The Solae Company

Ph: 314-982-5961

Fx: 314-982-2107

email: ghughes@solae.com