



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO

ESCOLA DE NUTRIÇÃO

ADRIANA MOURA VIEIRA

**EFEITOS DO CONSUMO DE SOJA E PROTEÍNA
ISOLADA DE SOJA POR RATAS *WISTAR* NA
LACTAÇÃO SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL,
HORMONAL E METABÓLICO DA PROGÊNIE
ADULTA**

OURO PRETO

2016

ADRIANA MOURA VIEIRA

**EFEITOS DO CONSUMO DE SOJA E PROTEÍNA
ISOLADA DE SOJA POR RATAS *WISTAR* NA
LACTAÇÃO SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL,
HORMONAL E METABÓLICO DA PROGÊNIE
ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição como requisito para a obtenção do título de mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição

Linha de Pesquisa: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição

Orientadora: Dra. Aline Silva de Aguiar

Co-orientadora: Dra. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti

OURO PRETO

2016

V658e Vieira, Adriana Moura.
Efeitos do consumo de soja e proteína isolada de soja por ratas Wistar na lactação sobre o estado nutricional, hormonal e metabólico da progênie adulta [manuscrito] / Adriana Moura Vieira. - 2016.
99f.: il.: tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Silva Aguiar.
Coorientadora: Profa. Dra. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.
Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

1. Soja. 2. Proteínas de Soja. 3. Metabolismo - Regulação. 4. Lactação. I. Aguiar, Aline Silva . II. Luquetti, Sheila Cristina Potente Dutra. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 612.392:612.664

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e nove do mês de abril de dois mil e dezesseis, às catorze horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Adriana Moura Vieira**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos professores Marcelo Eustáquio Silva (UFOP), Nathércia Percegoni (UFJF), Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti (UFJF) e Aline Silva de Aguiar (UFJF). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: **“Efeitos do consumo de soja e proteína isolada de soja por ratas *Wistar* na lactação sobre o estado nutricional, hormonal e metabólico da progênie adulta”**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



REPROVAR



Profa. Nathércia Percegoni (UFJF),
Examinadora Externa.



Profa. Marcelo Eustáquio Silva (UFOP),
Examinador Interno.



Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti (UFJF),
Coorientadora.



Profa. Aline Silva de Aguiar (UFJF),
Orientadora.



Adriana Moura Vieira,
Mestranda.

“Por mais árdua que seja a luta, por mais distante que um ideal se apresente, por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer: A nossa fé.”

Maria Angélica Boitar

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir concluir mais essa etapa.

À minha orientadora Aline e coorientadora Sheila que me receberam de braços abertos e me auxiliaram na execução desse trabalho. Com paciência e dedicação mostraram o caminho certo a percorrer e dividiram seus conhecimentos.

Aos colegas do laboratório de Nutrição Experimental (LABNE) que sempre estiveram de prontidão para ajudar. Em especial a Kácia, que gentilmente me recebeu no laboratório e auxiliou na execução dessa pesquisa. Foi um prazer poder dividir os dias com vocês.

À Poliana e Maíra por acreditarem em mim, permitindo que eu as auxiliasse nos seus trabalhos de conclusão de curso, e por dividirem suas experiências.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Nutrição pela acolhida, e por permitir conhecer pessoas maravilhosas, sentirei saudades.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia endócrina da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, em especial a Patrícia Lisboa e Mariana Figueiredo, pelos ensinamentos de dosagens, fundamentais para que este trabalho acontecesse.

À Leandra, ao João Pablo e ao Silvioney pela disposição em sempre ajudar.

A EMBRAPA pelo auxílio em algumas dosagens.

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto pela ajuda sempre que precisei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais e toda minha família que sempre acreditaram em mim, sem vocês nada disso seria possível.

À Talita por me acolher em Juiz de Fora e ser minha parceira de longa data.

Vocês foram fundamentais para a conquista dessa vitória.

RESUMO

Introdução: A soja vem sendo apontada como capaz de atuar na prevenção de diversas doenças. Entretanto, por ser rica em fitoestrogênios, tem sido questionada a segurança do seu consumo ou de seus constituintes em fases críticas do desenvolvimento, podendo programar alterações endócrinas e metabólicas na vida adulta. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do consumo de soja e proteína isolada de soja por ratas durante a lactação sobre o estado nutricional, parâmetros metabólicos e hormonais da prole adulta. **Metodologia:** Ratas *Wistar* lactantes foram divididas em 2 modelos experimentais conduzidos simultaneamente: Modelo 1 (6 ratas/grupo com 6 filhotes machos): Controle Caseína (C): livre acesso a dieta a base de caseína (% do valor energético: 18,5% de proteína, 63,5% de carboidrato, 17,8% de lipídeo); Soja (S): livre acesso a dieta a base de farinha de soja (% do valor energético: 18,3% de proteína, 43,5% de carboidrato, 38,1% de lipídeo); Controle Soja (CS): livre acesso a dieta a base de caseína, porém com teor lipídico semelhante ao grupo Soja (17,8% de proteína, 45,5% de carboidrato, 36,8% de lipídeos). Modelo experimental 2 (6 ratas/grupo com 6 filhotes machos): Controle Caseína (C): livre acesso a dieta a base de caseína (% do valor energético: 18,5% de proteína, 63,5% de carboidrato, 17,8% de lipídeo); Proteína isolada de soja (PIS): livre acesso a dieta a base de proteína isolada de soja (% do valor energético: 20,3% de proteína, 62,1% de carboidrato e 17,4% de lipídeos). Ao desmame (21 dias), 3 filhotes por ninhada foram randomicamente separados em gaiolas com água e ração comercial *ad libitum* até 150 dias. A ingestão alimentar (IA) e a massa corporal (MC) foram monitorados diariamente até o desmame e posteriormente de 4 em 4 dias. A adiposidade central (somatório das gorduras: perigonadal, subcutânea e retroperitoneal) e a composição corporal (Método Carcaça) também foram avaliadas. Avaliou-se no soro das ratas e das proles (21 e 150 dias): triiodotironina total (T3T), tiroxina livre (T4L) e insulina (Radioimunoensaio – RIA), leptina (Elisa), glicemia, colesterol total (CT), colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos (TG), além do 17 β -estradiol sérico (RIA) materno. No leite foi avaliado o conteúdo de proteína, CT, TG e leptina. Para comparação dos grupos, utilizou-se o teste ANOVA one-way com pós- teste de Newman-Keuls no modelo experimental 1 e teste *t-student* no modelo experimental 2, sendo considerado

$p < 0,05$. **Resultados:** As mães S apresentaram aumento esporádico da IA, sem alterar a MC; diminuição do estradiol sérico, e do CT e LDL no soro e leite; bem como aumento de T4L sérico. A prole S, não alterou a IA, entretanto sua MC foi menor em relação ao CS, do 6º ao 21º dia; a gordura corporal total foi menor aos 21 dias e o conteúdo mineral total maior aos 150 dias, em relação aos controles. Ao desmame, ocorreu hiperleptinemia, hipertrigliceridemia e redução de CT e LDL séricos quando comparado aos controles, e T4L apenas em relação ao C. Na prole CS, o CT e LDL aumentaram e o TG diminuiu em relação ao C. Na vida adulta, a prole S apresentou aumento de T4L (versus C), diminuição de CT (versus C e CS) e LDL (versus CS), insulinemia aumentada com diminuição da glicemia somente quando comparada a prole CS, a qual apresentou menor insulinemia com maior glicemia, níveis aumentados de CT e LDL. Nas mães PIS também se observou aumento esporádico da IA, sem alterar a MC, e aumento do T4L. A prole PIS não alterou a IA e a MC, porém diminuiu o conteúdo mineral e a proteína corporal total na vida adulta. Aos 21 dias, o CT e TG diminuíram; e aos 150 dias, observou-se aumento do T4L, insulina, CT e TG séricos. **Conclusão:** O consumo materno de S e PIS na lactação programa de forma diferente o estado nutricional, bioquímico e metabólico da progênie adulta, sendo evidenciadas modificações mais positivas com a ingestão da soja. A maior oferta de isoflavonas da dieta soja, a diminuição materna de estradiol sérico e a hiperleptinemia ao desmame da prole soja, podem ser os fatores implicados nas diferenças encontradas.

ABSTRACT

Introduction: Soy has been identified as able to act in the prevention of various diseases. However, the safety of soy consumption has been questioned, during critical stages of development, due to the amount of phytoestrogens as its constituents, which may lead to endocrine and metabolic disorders in adulthood. **Objective:** Evaluate the effects of soy consumption and isolated soy protein in rats during lactation on the nutritional status, metabolic and hormonal parameters of offspring in adulthood. **Methods:** Lactating Wistar rats were randomly assigned to two independent experiments, however conducted simultaneously: Experimental Model 1 (6 rats / group with 6 male offspring): Casein (C): free access to diet based on casein (% of energy: 18.5% protein, 63.5% carbohydrate, 17.8% lipid); Soy (S): free access to diet soy flour basis (% of energy: 18.3% protein, 43.5% carbohydrate, 38.1% lipid); Soy Control (SC): free access to diet based on casein, but with a fat content similar to the soy group (17.8% protein, 45.5% carbohydrate, 36.8% fat). Experimental model 2 (6 rats / group with 6 male offspring): Casein Control (C): free access to diet casein based (% of energy: 18.5% protein, 63.5% carbohydrate, 17, 8% lipid); Soy Isolated Protein (SIP): free access to dietary protein isolate soy (% of energy: 20.3% protein, 62.1% carbohydrate and 17.4% lipids). At weaning (21 days), 3 pups per litter were randomly separated into cages with water and commercial feed ad libitum up to 150 days. Food intake (FI) and body mass (BM) were monitored daily until weaning and there after 4 for 4 days. The central adiposity (fat sum of: perigonadal, subcutaneous and retroperitoneal) and body composition (Casting method) were also evaluated. Evaluated in the serum of dams and offspring (21 and 150 days): Total triiodothyronine (TT3), free thyroxine (FT4) and insulin (radioimmunoassay - RIA), leptin (Elisa), glucose, total cholesterol (TC), cholesterol LDL, HDL cholesterol, triglycerides (TG), and serum 17 β -estradiol (RIA) in dams. In milk was assessed the protein content, TC, TG and leptin. To compare the groups, we used the one-way ANOVA test with Newman-Keuls post-test the experimental model 1 and t-student test the experimental model 2, being considered $p < 0.05$. **Results:** The S dams showed sporadic increase in the feed ingestion without modified body mass; decrease in estradiol, TC and LDL; and increase of T4. The S offspring,

did not change the FI, however their BM was lower compared to SC from day 6 to day 21; total body fat was lower at 21 days and the total mineral content increased to 150 days compared to controls. At weaning, there hyperleptinaemia, hypertriglyceridemia and reduced TC and LDL compared serum to controls, and FT4 only to C. In CS offspring, TC and LDL increased and TG decreased compared to C. In adult life, offspring S showed an increase of FT4 (versus C), decreased CT (versus C and CS) and LDL (versus CS), insulin increased with decreased blood glucose only when compared to CS offspring, which had lower insulin with higher blood glucose levels, increased TC and LDL. In SIP mothers also observed sporadic increase of FI without changing the BM, and increased FT4. The SIP offspring did not change the FI and the BM, but reduced the mineral content and total body protein in adult life. At 21 days, the TC and TG decreased; and at 150 days, there was increased FT4, insulin, TC and TG serum. **Conclusion:** The maternal consumption of S and SIP, during lactation, program differently the nutritional status, biochemical and metabolic of adult offspring, with evident positive changes over with the intake of soy. Most isoflavone offer soy diet, maternal decrease in serum estradiol and hyperleptinaemia weaning the soy offspring may be the factors involved in the differences found.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – adenosina 3',5' monofosfato cíclico

CPT1L – Carnitina palmitoil tranferase 1

C – Controle

CT – Colesterol Total

CS – Controle Soja

D1 ,D2 e D3– Iodotironinas Desiodases

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

MIT – Moniodotirosina

PPAR – Receptores ativados por proliferador de peroxissoma

PIS – Proteína Isolada de Soja

rT3 – T3 reverso

S – Grupo Soja

T2 – Diiodotirosina

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

TBPA – Pré-albumina ligadora de tiroxina

TG – Triglicerídeos

Tgb – Tireoglobulina

TBG – Globulina ligadora de tiroxina

TPO – Peroxidase Tireóidea

TR – Receptores dos Hormônios Tireoidianos

TRH – Hormônio Liberador da Tireotrofina

TSH – Tireotrofina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição nutricional, a cada 100 gramas, da farinha de soja.	22
Tabela 2: Conteúdo de Isoflavonas nos alimentos à base de soja.....	24
Tabela 3: Diferenças na síntese e transporte de T3 e T4	35
Tabela 4: Funções fisiológicas dos hormônios tireoidianos	37
Tabela 5: Composição centesimal da soja orgânica utilizada na confecção da ração do grupo soja.....	47
Tabela 6: Composição das dietas dos grupos experimentais	48
Tabela 7: Conteúdo de Proteína, Colesterol total, Triglicerídeos e Leptina do leite das ratas que consumiram S durante a lactação	54
Tabela 8: Perfil hormonal, homeostase glicêmica e perfil lipídico das ratas dos grupos controle, controle soja e soja.....	55
Tabela 9: Adiposidade central e composição corporal das proles dos grupos experimentais aos 21 e 150 dias de idade.	57
Tabela 10: Resumos do resultados das mães grupo controle, controle soja e soja.....	62
Tabela 11: Resumo dos resultados da prole ao desmame do grupo controle, controle soja e soja	63
Tabela 12: Resumo dos resultados da prole adulta dos grupos controle, controle soja e soja	64
Tabela 13: Conteúdo de proteína, colesterol total, triglicerídeos e leptina do leite das ratas que consumiram proteína isolada de soja durante a lactação ..	66
Tabela 14: Perfil hormonal e metabólico das ratas PIS ao desmame	67
Tabela 15: Adiposidade central e composição corporal das proles PIS aos 21 e 150 dias de idade.	69
Tabela 16: Resumo dos resultados maternos e da prole aos 21 e 150 dias do grupo proteína isolada de soja	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas das Isoflavonas presentes na soja.....	23
Figura 2: Ação da Genisteína sobre oxidação dos ácidos graxos independentemente da leptina.	27
Figura 3: Estrutura química dos hormônios tireoidianos.	33
Figura 4: Síntese e Liberação dos hormônios tireoidianos envolvendo o iodo. Tireoglobulina (Tgb), Monoidotirosina (MIT), Diiodotirosina (DIT), Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)..	34
Figura 5: Atuação das enzimas desiodases.....	36
Figura 6: Consumo diário de ração (A), massa corporal (B) e adiposidade central das ratas lactantes que receberam dieta Controle (C), Controle Soja (CS) e Soja (S).....	53
Figura 7: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) das ratas lactantes que receberam dieta Controle (C), Controle Soja (CS) e Soja (S) ao final da lactação..	54
Figura 8: Consumo de ração (A) e massa corporal da prole durante a lactação (B) e até a vida adulta (C), cuja as mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação	56
Figura 9: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) da prole aos 21 e 150 dias, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação.....	58
Figura 10: Concentrações séricas de T ₄ Livre (A) e T ₃ Total (B) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação.....	59
Figura 11: Leptinemia da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação .	59
Figura 12: Insulinemia (A), glicemia (B) e Índice de Resistência à Insulina (IRI) (C) das proles aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação.	60
Figura 13 Níveis séricos de Colesterol Total (A), Colesterol LDL (B) Colesterol HDL (C) e Triglicerídeos (D) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação.	61

Figura 14: Consumo diário de ração (A), massa corporal (B) e adiposidade central (C) das ratas que receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação	65
Figura 15: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) das ratas que receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação.....	66
Figura 16: Consumo de ração (A) e massa corporal (B) da prole, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação.....	68
Figura 17: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação.....	70
Figura 18: Concentrações séricas de T4 livre (A) e T3 total (B) da prole aos 21 e 150 dias, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação.....	70
Figura 19: Leptinemia da prole aos 21 e 150 dias (B), cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação	71
Figura 20: Níveis séricos de insulina (A), glicose (B) das proles aos 21 e 150 dias, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação.....	71
Figura 21: Concentrações séricas de Colesterol Total (A), Colesterol LDL (B) Colesterol HDL (C) e Triglicerídeos (D) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS).....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	18
2.2 SOJA	21
2.2.1 SOJA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E FITOQUÍMICA	21
2.2.2 COMPONENTES DA SOJA E SEUS EFEITOS METABÓLICOS NO ORGANISMO.....	24
2.2.3 COMPONENTES DA SOJA E SUA RELAÇÃO COM A PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	30
2.3 SÍNTESE, SECREÇÃO E METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	32
2.3.1 EFEITO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NO ORGANISMO	37
2.3.2 COMPONENTES DA SOJA E FUNÇÃO TIREOIDIANA.....	38
2.3.3 COMPONENTES DA SOJA E PROGRAMAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA.....	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	44
4.2 RAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	46
4.3 EXTRAÇÃO DE LEITE E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA NO LEITE	49
4.4 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	50
4.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	50
4.6 PERFIL LIPÍDICO.....	51
4.7 DOSAGENS HORMONAIS	51
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5. RESULTADOS	53
5.1 MODELO EXPERIMENTAL 1 – EFEITOS DO ALIMENTO SOJA	53
5.1.1 ESTADO NUTRICIONAL DAS RATAS LACTANTES	53

5.1.2	CONTEÚDO DE PROTEÍNA, COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEO E LEPTINA DO LEITE DAS RATAS LACTANTES	54
5.1.3	PERFIL HORMONAL E METABÓLICO AO DESMAME DAS RATAS LACTANTES	55
5.1.4	ESTADO NUTRICIONAL DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM SOJA NA LACTAÇÃO.....	56
5.1.5	PERFIL HORMONAL E METABÓLICO DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM SOJA NA LACTAÇÃO.....	58
5.2	MODELO EXPERIMENTAL 2 – EFEITOS DA PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA	65
5.2.1	ESTADO NUTRICIONAL DAS RATAS LACTANTES	65
5.2.2	CONTEÚDO DE PROTEÍNA, COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEO E LEPTINA DO LEITE DAS RATAS LACTANTES	66
5.2.3	PERFIL HORMONAL E METABÓLICO AO DESMAME DAS RATAS LACTANTES	67
5.2.4	ESTADO NUTRICIONAL DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM PIS NA LACTAÇÃO	68
5.2.5	PERFIL HORMONAL E METABÓLICO DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM PIS NA LACTAÇÃO.....	70
6.	DISCUSSÃO	74
7.	CONCLUSÃO.....	84
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine Max (L.) Merril*) é uma planta oleaginosa de alto valor nutricional, tendo elevado teor de proteína (40%) e de gordura (20%), principalmente insaturada (23% de gordura monoinsaturada, 8% de linolênico e 54% de linoleico). Também é fonte de vários fitoquímicos, que estão normalmente associados à proteína, com destaque para as isoflavonas (MIURA *et al.*, 2001).

Essa leguminosa e seus constituintes, proteína isolada de soja (PIS) e isoflavonas, vêm sendo amplamente estudadas. Entre seus possíveis efeitos benéficos sobre o organismo, destacam-se a redução dos níveis de colesterol total, LDL colesterol, da insulinemia e da resistência à insulina, assim como da adiposidade e da massa corporal (LIBRENTI *et al.*, 1992; ANDERSON *et al.*, 1995; BHATHENA & VELASQUEZ, 2002; ZHAN & HO, 2005; CEDERROTH *et al.*, 2007; CEDERROTH *et al.*, 2008; SIMMEN *et al.*, 2010, JUNGBAUER & MEDJAKOVIC, 2014). Esses benefícios têm impulsionado a produção cada vez maior de alimentos e suplementos com esses compostos pela indústria alimentícia, e o seu consumo pela população (SETCHEL *et al.*, 2001).

As isoflavonas, compostos polifenólicos, possuem estrutura semelhante à do 17- β -estradiol e podem interagir de forma agonista ou antagonista com os receptores de estrogênios no organismo (PERON *et al.*, 2008). Devido essa atividade estrogênica, têm se questionado a segurança do seu consumo em fases críticas do desenvolvimento, como a gestação e a lactação (RUHLEN *et al.*, 2008; CEDERROTH *et al.*, 2010; PFAEHLER, *et al.*, 2012), uma vez que podem atuar como disruptores de sistemas chave hormonais que controlam o crescimento e o desenvolvimento, gerando permanentes modificações estruturais, metabólicas e funcionais de tecidos e sistemas do organismo, que podem estar associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas, processo esse denominado de programação (BARKER, 1998; MOURA & PASSOS, 2005).

Além disso, sugere-se que a qualidade da proteína da soja, o seu perfil de aminoácidos, a presença de peptídeos bioativos e a cinética de digestão, também podem ser responsáveis por programar alterações hormonais e

metabólicas na descendência na vida adulta (JAHAN-MIHAN *et al.*, 2011a, JAHAN-MIHAN *et al.*, 2011b).

Estudos que evidenciam o papel do consumo de soja ou da PIS sobre parâmetros endócrinos e metabólicos durante fases críticas do desenvolvimento, são escassos e apresentam resultados controversos, especialmente no que tange a função tireoidiana. Vale ressaltar, que o efeito do consumo de soja ou PIS somente no período da lactação, ainda não foi investigado, e que a maioria dos estudos trabalharam com as isoflavonas isoladas adicionadas na ração, e não com o alimento soja, sendo importante determinar a ação do alimento no organismo, já que existem evidências que o consumo do alimento é capaz de trazer benefícios que não são replicados quando há ingestão do nutriente ou composto bioativo isolado (CERQUEIRA *et al.*, 2007)

Assim, considerando o impacto à longo prazo de alterações nutricionais e hormonais ocorridas na lactação, bem como o crescente consumo da soja e seus componentes, é importante investigar se há consequências da exposição precoce desta leguminosa rica em fitoestrogênios e de sua proteína isolada, sobre parâmetros nutricionais, endócrino e metabólicos da progênie na vida adulta, podendo assim, determinar a segurança ou os benefícios do consumo deste tipo de alimento em fases críticas do desenvolvimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

Desde o período de desenvolvimento intra-uterino pode-se expor o feto a um risco de desenvolver doenças na idade adulta. Nesse aspecto, a hipótese denominada de Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD), destaca a relação entre os estímulos em fases iniciais da vida e o posterior desenvolvimento de doenças. Esse modelo investiga as adaptações que ocorrem no feto em resposta a sinais do ambiente intrauterino, que resultam em permanente ajuste de sistemas homeostáticos com a finalidade de ajudar na sobrevivência imediata e na melhora do sucesso em um ambiente pós-natal adverso. No entanto, interpretações inadequadas ou mudanças ambientais podem levar a uma incompatibilidade entre as previsões pré-natais e a realidade pós-natal (GLUCKMAN *et al.*, 2008; LAKER *et al.*, 2013).

Desta forma, essas adaptações conhecidas como respostas adaptativas preditivas, podem ser desvantajosas na vida adulta, conduzindo para um aumento do risco de doenças que podem ser transmitidas às próximas gerações. Nesta perspectiva, tem-se estabelecido que alterações nutricionais no início da vida acarretam um aumento do risco para uma série de doenças na idade adulta (FERNANDEZ-TWINN & OZANNE, 2010).

Vários estudos têm demonstrado associação entre desnutrição materna e exposição a hormônios na gestação e lactação, com futuras disfunções metabólicas, com destaque para as doenças crônicas não transmissíveis, distúrbios da tireoide, e componentes da síndrome metabólica (BARKER, 1998; DUTRA *et al.*, 2003; MOURA & PASSOS 2005; PASSOS, 2007; LISBOA *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2008). O tipo de desnutrição que a mãe é submetida é capaz de interferir no estado nutricional da prole adulta. Filhotes cujas mães sofreram restrição proteica na lactação, apresentaram baixo peso corporal do desmame aos 6 meses de idade. Já a restrição calórica levou a prole na idade adulta (6 meses), a ganhar mais peso em relação ao controle, e a desenvolver

uma resistência a ação anorexígena do hormônio leptina (PASSOS *et al.*, 2004).

Segundo Troina *et al* (2010), o consumo materno de linhaça durante a lactação foi capaz de programar para o aumento de gordura total e visceral e das concentrações séricas de colesterol e triglicérides na prole fêmea adulta. Já Figueiredo *et al* (2009), demonstraram que o consumo de linhaça durante a lactação levou a descendência macho adulta a apresentar maior massa corporal, menor glicemia, maior insulínia e menor adiponectina sem alterar a composição corporal

Além disso, modelos experimentais de injeção de leptina nos 10 primeiros dias de vidas (TOSTE *et al.*, 2006a; TOSTE *et al.*, 2006b) e bloqueio de prolactina (BONOMO *et al.*, 2007) ao final da lactação, programam a prole adulta para hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipercolesterolemia, resistência à insulina e leptina.

Assim, é possível notar que a programação ocorrida na fase crítica do desenvolvimento, pode levar a alterações em tecidos e órgãos, que se estendem ao longo da vida; podendo ainda, haver um período de latência e as manifestações ocorrerem somente da vida adulta (CRUZ, 2004). Cada vez mais estudos vêm surgindo de forma a explicar os possíveis mecanismos relacionados com a programação metabólica.

Estes mecanismos, ainda não foram totalmente elucidados, mas acredita-se que haja uma relação com alterações no desenvolvimento estrutural dos órgãos, ou alteração persistente ao nível celular, sendo postulado de acordo com Koletzko *et al* (2011):

- Participação da memória epigenética, com modificação no processo da transcrição;
- Alteração da estrutura dos órgãos na vascularização, inervação e justaposição, como por exemplo, a posição dos hepatócitos, células endoteliais e células de Kupffer, que durante a organogênese podem modificar o metabolismo de forma permanente;

- Ocorrência de hiperplasia ou hipertrofia, levando a alterações no número de células;
- Crescimento anormal das células de proliferação rápida em condições metabólicas específicas (Seleção Clonal);
- Processo de diferenciação metabólica.

Nota-se que os mecanismos moleculares propostos, incluem as alterações agudas ou crônicas na expressão gênica, através de várias vias epigenéticas, onde existe uma inter-relação entre determinados genes, exposição a fatores ambientais e eventos biológicos posteriores (HANLEY *et al.*, 2010).

Ainda assim, há muito o que se compreender, embora a epigenética ajude a entender como a exposição aos fatores ambientais, em períodos críticos de desenvolvimento, levam a alterações na vida adulta, é necessário desvendar as modificações pós-epigenéticas envolvidas nos diferentes processos que leva ao surgimento das doenças (KOLETZKO *et al.*, 2011).

2.2 SOJA

2.2.1 SOJA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E FITOQUÍMICA

A soja é uma planta oleaginosa, pertence ao gênero *Glycine Max* e à família *Fabacea (Leguminosae)*. Essa leguminosa vem sendo cultivada no Brasil há mais de 130 anos, abrangendo de norte a sul do país (FREITAS, 2011). Segundo o 1º levantamento da Safra Brasileira de Grãos 2014/2015, a estimativa de produção de soja atingirá em média 90,62 milhões de toneladas no ano de 2015, sendo aproximadamente 42,2 milhões de toneladas destinadas ao consumo interno (CONAB, 2014).

Essa cultura é uma das mais importantes dentro da economia mundial, sendo seus grãos utilizados na agroindústria, na indústria química e na de alimentos (FREITAS, 2011). Atualmente, tem crescido o interesse da indústria alimentícia na produção de produtos à base de soja, uma vez que estudos têm evidenciado o papel desta leguminosa na prevenção de doenças, fornecendo inúmeros benefícios à saúde do consumidor.

No âmbito desta discussão, em 1999 o órgão de controle de alimentos dos Estados Unidos (FDA), reconheceu a soja como um alimento funcional, recomendando um consumo de 40-60 mg de isoflavonas/dia, na forma não conjugada (FDA, 1999). No Brasil em 2005, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), incluiu a soja na lista de alimentos com capacidade funcional, e determinou que o consumo diário de 25 g de soja é capaz de proteger contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ANVISA, 2007).

A soja além de ser uma ótima fonte proteica, é rica em ácidos graxos poliinsaturados, isoflavonas, saponinas, tocoferol, esteróis e estenóis, e uma boa fonte de minerais, como o ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre, fósforo, manganês e vitaminas do complexo B (PENHA *et al.*, 2007). Além disso, possui fitatos e inibidores de tripsina, que são inativados por meio do processamento térmico em que a soja é submetida (PENHA 2007). A tabela 1 exemplifica, conforme a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) 2011, a composição nutricional da farinha de soja, um derivado obtido após o

processamento térmico e moagem do grão de soja, utilizado na confecção da ração do grupo soja no presente estudo.

Tabela 1: Composição nutricional, a cada 100 gramas, da farinha de soja.

Energia e Macronutrientes								
Energia (kcal)		Carboidratos (g)		Proteínas(g)		Lipídeos (g)		
404		38,4		36		14,6		
Minerais								
Cálcio (mg)	Magnésio (mg)	Manganês (mg)	Fósforo (mg)	Ferro (mg)	Sódio (mg)	Potássio (mg)	Cobre (mg)	Zinco (mg)
206	242	2,87	539	13,1	6	1922	1,29	4,5
Vitaminas								
Tiamina (mg)			Riboflavina (mg)			Pirodoxina (mg)		
0,20			0,04			0,03		

Fonte: TACO, 2011.

Dentre os constituintes presentes na soja, grande importância tem sido dada às isoflavonas, devido ao seu potencial terapêutico apresentado em diversos estudos (BHATHENA & VELASQUEZ, 2002; BEDANI & ROSSI, 2005; PENHA *et al.*, 2007; PERON *et al.*, 2008). Entre as principais isoflavonas destacam-se a genistina, daidzina, gliciteína, encontradas principalmente conjugadas a uma molécula de glicose nos vegetais, que ao serem ingeridas são hidrolisadas pelas β -glucosidases bacterianas, formando as formas agliconas (não-conjugadas), daidzeína, genisteína e glicitina, consideradas biologicamente ativas. Após serem absorvidas, as isoflavonas podem sofrer conjugação com grupos acetil e malonil no fígado, originando as formas

acetilglicosada e malonilglicosada (CLAPAUCH *et al.*,2002; PENHA *et al.*, 2007), conforme apresentado na figura 1.

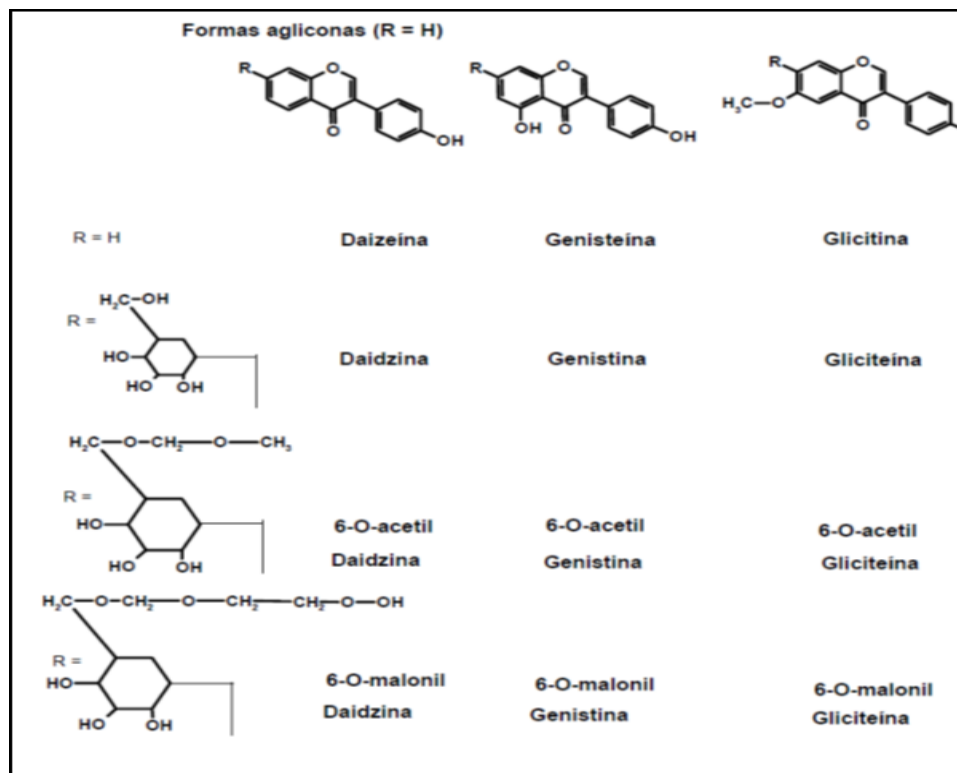


Figura 1: Estruturas das Isoflavonas presentes na soja. A primeira sequência refere-se às formas agliconas (Daidzeína, Genisteína e Gliciteína), seguida das formas conjugadas com a glicose (Daidzina, Genistina, Gliciteína), o acetil (6-O-acetil Daidzina, 6-O-acetil Genistina e 6-O-acetil Gliciteína) e o malonil (6-O-malonil Daidzina, 6-O-malonil Genistina e 6-O-malonil Gliciteína). Fonte: Penha *et al.*, 2007.

Vale ressaltar que os produtos derivados da soja, também apresentam isoflavonas em sua constituição e que a quantidade de isoflavonas presente pode sofrer alteração dependendo das condições de processamento que a soja é submetida (BEDANI & ROSSI, 2005). A seguir estão apresentados o teor de isoflavonas em alimentos à base de soja, comumente ingeridos (Tabela 2).

Tabela 2: Conteúdo de Isoflavonas nos alimentos à base de soja

Alimento	Isoflavonas (mg/100g)
Farinha de soja desengordurada	191
Farinha Integral	200
Fórmulas Infantis	7,0 a 20,3
Grãos de Soja	110
Grãos de Soja Cozidos	44,08
Leite de soja	7,05 a 9,7
Proteína Texturizada de Soja	95
Tofu	16,3 a 29,2

Fonte: Adaptado de CLAPAUCH *et al*, 2002; ROSSI *et al*, 2004; BARBOSA *et al*, 2006.

Mediante aos aspectos mencionados, é possível concluir que a soja é um alimento rico do ponto de vista nutricional. Dessa forma, vários estudos têm utilizado essa leguminosa ou alguns de seus componentes a fim de determinar as suas ações sobre o metabolismo, prevenindo a ocorrência de doenças. Porém, estudos que abordem a segurança do seu consumo em fases críticas do desenvolvimento são ainda escassos na literatura, necessitando de mais pesquisas sobre esse tema.

2.2.2 COMPONENTES DA SOJA E SEUS EFEITOS METABÓLICOS NO ORGANISMO

Inúmeras pesquisas evidenciam o papel da soja no controle de diversas morbidades, levando a melhora da glicemia, com diminuição da insulinemia e da resistência à insulina, assim como diminuição da esteatose hepática, da adiposidade e da massa corporal (NORIEGA-LÓPEZ *et al.*, 2007; VELASQUEZ *et al.*, 2007; CEDERROTH *et al.*, 2007; CEDERROTH *et al.*, 2008; SIMMEN *et al.*, 2010). A PIS também vem sendo apontada como capaz de reduzir à insulina sérica e à resistência a sua ação, melhorando o quadro de

hiperglicemia, atuando no controle da diabetes (LIBRENTI *et al.*, 1992; BHATHENA & VELASQUEZ, 2002).

Embora não haja consenso entre os autores, os efeitos benéficos da soja têm sido atribuídos principalmente às isoflavonas e a PIS, que também apresenta isoflavonas. Ressalta-se que as isoflavonas possuem estrutura semelhante à do 17- β -estradiol, podendo atuar como fitoestrogênio, ou seja, substâncias semelhantes ao hormônio estrogênio, sendo capazes de interagir de forma agonista ou antagonista com seus receptores no organismo dependendo da dose utilizada e do tecido alvo (KOSTELAC *et al.*, 2003; PERON *et al.*, 2008).

Além da ação estrogênica, as isoflavonas, principalmente a genisteína, desempenham outras funções no organismo, atuando sobre o crescimento e a regulação de vários tipos de células. Tem sido evidenciado o seu papel como alternativa promissora na prevenção e tratamento de alguns tipos de cânceres, doenças cardiovasculares, osteoporose e diminuição dos sintomas da menopausa (BEDANI & ROSSI, 2005).

Ferguson *et al.* (2014) avaliaram a relação do consumo de alimentos contendo isoflavonas, sobre a resposta inflamatória decorrente da endotoxemia transitória, observando um aumento da resposta imune relacionada ao consumo de isoflavonas. Além disso, houve proteção na inflamação induzida pelo declínio da resistência à insulina, e aumento da homeostase da glicose na resposta ao teste de tolerância à glicose (FERGUNSON *et al.*, 2014).

Jungbauer & Medjakovic (2014) em seu artigo de revisão sobre os fitoestrogênios e síndrome metabólica, evidenciaram estudos que apontam o papel das isoflavonas na prevenção da síndrome metabólica, proteção das células endoteliais ao estresse oxidativo e transporte reverso de colesterol, sendo o último atribuído a ação da PIS (JUNGBAUER & MEDJAKOVIC, 2014).

Em relação aos lipídeos, foi demonstrado que o consumo da soja, das isoflavonas e/ou da PIS, reduz os níveis de colesterol total, LDL e triacilgliceróis. (ANDERSON *et al.*, 1995, ZHAN & HO, 2005). Nesse aspecto, as isoflavonas são capazes de regular a expressão de diversos genes

envolvidos no anabolismo e catabolismo de lipídeos em diferentes tecidos de depósitos (tecido adiposo, fígado e músculo esquelético), bem como a expressão de citocinas musculares (miocinas) e adipocinas, juntamente ao aumento da adiponectina. Fatos estes que explicam o possível mecanismo de atuação dos fitoestrogênios sobre o perfil lipídico (YANG, 2012). Os hormônios tireoideos também parecem mediar estes efeitos benéficos da soja (SIMMEN *et al.*, 2010).

Ainda nesse sentido, foi demonstrada a capacidade da genisteína em ativar os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR), um membro da família dos receptores nucleares, que controla a transcrição de muitos genes envolvidos no catabolismo de lipídeos, como a carnitina palmitoil tranferase 1 (CPT1L), cuja expressão foi aumentada na presença da genisteína (KIM *et al.*, 2004). Pré-adipócitos humanos, durante o período de diferenciação, tratados com genisteína, apresentaram menor acúmulo de lipídeos, diminuição da diferenciação celular e da atividade de glicerol- 3- fosfato desidrogenase (GPDH), um marcador final da diferenciação dos adipócitos (PARK *et al.*, 2009).

Outro estudo, utilizando camundongos recebendo dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica mais genisteína, demonstrou a capacidade da genisteína em ativar a adenosina 5' monofosfato proteína quinase (AMPK) no músculo de animais, independente dos receptores de leptina, que encontravam-se silenciados. Assim foi postulado que essa fosforilação ocorreu provavelmente via Janus quinase (JAK2), através de mecanismos envolvendo adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) (PALACIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2014), conforme a figura 2. Esta reação intracelular resulta em maior atividade mitocondrial, com aumento na β -oxidação lipídica e conseqüentemente maior gasto calórico.

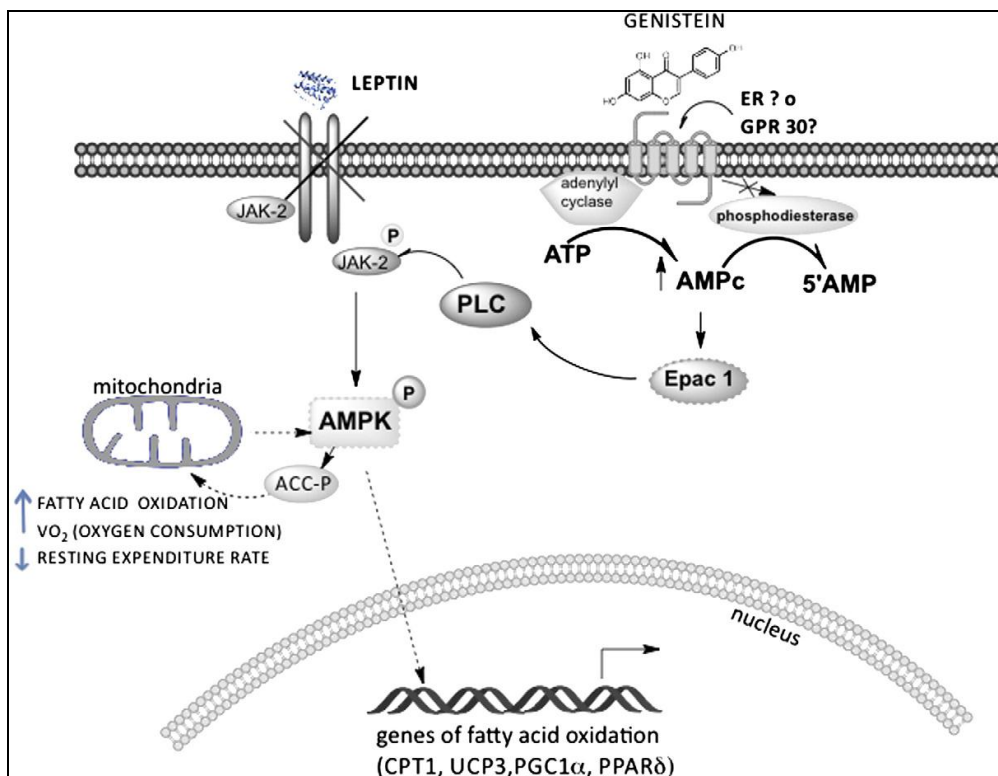


Figura 2: Ação da Genisteína sobre oxidação dos ácidos graxos independentemente da leptina. Fonte: PALACIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2014.

No que tange a ação da PIS sobre o perfil lipídico, foi demonstrado que ratos obesos alimentados com proteína de soja apresentaram menor depósito de lipídeos no músculo esquelético em relação ao grupo controle. A fim de esclarecer o possível mecanismo envolvido neste achado, foi determinado o nível de fosforilação da AMPK e da acetil CoA carboxilase (ACC), que estiveram aumentadas no grupo que consumiu PIS. Houve ainda, maior expressão de PPAR δ , CPT-1 e Proteína de desacoplamento mitocondrial (UCP3), indicando maior oxidação de ácidos graxos, com aumento da termogênese. Por sua vez, os genes lipogênicos como a proteína de ligação do elemento de regulação do esteroil (SREBP-1) e esteroil – CoA dessaturase (SCD1) estiveram significativamente mais baixos neste grupo (PALACIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

O consumo de PIS também vem sendo evidenciado como capaz de levar ao aumento da excreção de sais biliares e conseqüentemente diminuição das concentrações séricas de colesterol (CARVALHO, 2014; GONZÁLEZ-

GRANILLO *et al*, 2012). Neste aspecto, foi demonstrado que camundongos LXR α ^{+/+} e LXR α ^{-/-} designados para receber dieta caseína, caseína + 2% de colesterol, PIS e PIS + 2% de colesterol, apresentaram menor grau de esteatose hepática quando recebiam dieta PIS em relação ao grupo caseína. Outro achado foi que o consumo de PIS aumentou a excreção de sais biliares fecal nos camundongos LXR α ^{+/+}, mas não nos camundongos LXR α ^{-/-}. Sabe-se que o receptor X alfa (LXR) α no fígado, é responsável em parte pelo fluxo inter-órgão do colesterol e síntese de ácidos biliares. Assim é sugerido que a proteína de soja regule o metabolismo do colesterol através da ativação do LXR α (González-Granillo *et al*, 2012).

Frigolet *et al* (2009), conduziram um estudo com 4 grupos experimentais: Caseína, Caseína hiperlipídica, Proteína de soja e Proteína de soja Hiperlipídica. Foi observado que as dietas hiperlipídicas levaram ao maior número de adipócitos, contudo no grupo proteína de soja hiperlipídica estes foram 49% menores. Outro dado relevante é que ocorreu hipertrofia do tecido adiposo no grupo caseína hiperlipídico, já nas dietas a base de proteína de soja houve uma redução desta relação, indicando um processo adipogênico ativo, que evita a hipertrofia dos adipócitos. Por fim, foram analisados a expressão de mRNA de leptina e de genes de oxidação de ácidos graxos, sendo observado diminuição do mRNA de leptina nos grupos alimentados com proteína de soja em relação ao grupo caseína, e uma maior expressão de PPAR γ , PPAR α e CPT-1 neste grupo (FRIGOLET *et al.*, 2009).

Apesar das evidências da diminuição dos níveis de leptina sanguínea e na sua secreção pelo tecido adiposo perante o consumo de isoflavonas (SZKUDELSKI *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2012) ou da proteína de soja (NAGASAWA *et al.*, 2003), os estudos abordando esse tema são ainda controversos. Giordano *et al.* (2015) relataram o aumento da leptina circulante em animais machos recebendo dieta a base de isoflavonas de soja em relação ao grupo controle (GIORDANO *et al.*, 2015).

PHIPPS *et al* (2001) demonstraram em mulheres, na pré e pós – menopausa, que a ingestão de isoflavonas não foi capaz de alterar as concentrações de leptina (PHIPPS *et al.*, 2001). Outro achado evidenciou que o

consumo de uma dieta hiperlipídica, juntamente com a PIS, mantém os níveis circulares de leptina adequados, enquanto que a dieta hiperlipídica com caseína induziu à hiperleptinemia (TORRE-VILLALVAZO *et al.*, 2008).

Em relação a ingestão alimentar e o ganho de peso dos animais alimentados com soja ou algum de seus componentes, há evidências que sugerem a não modificação desses parâmetros em relação ao grupo controle (FRIGOLET *et al.*, 2009; GIORDANO *et al.*, 2015, NAGASAWA *et al.*, 2003). Porém, foi demonstrado um menor ganho de peso em animais alimentados com proteína de soja em relação ao grupo caseína (TORRE-VILLAZANO *et al.*, 2008), e que a ingestão de uma dieta hiperlipídica (25% de gordura) juntamente com a proteína de soja levou ao menor ganho de peso dos animais em relação ao grupo que ingeriu somente uma dieta hiperlipídica (TORRE-VILLAZANO *et al.*, 2008). O consumo de isoflavonas nas concentrações de 5% e 10% juntamente com uma dieta rica em gorduras, também levou a redução do peso corporal em relação ao grupo hiperlipídico, sendo a redução exacerbada de forma dose-dependente (JANG *et al.*, 2008).

Apesar de existirem controvérsias na literatura sobre o efeito da soja em alguns parâmetros endócrinos metabólicos, há fortes evidências dos benefícios da soja no controle de morbidades (LIBRENTI *et al.*, 1992; BHATHENA & VELASQUEZ, 2002; BEDANI & ROSSI, 2005; FERGUSON *et al.*, 2014; JUNGBAUER & MEDJAKOVIC, 2014). Entretanto, alguns estudos têm questionado a segurança da introdução precoce de alimentos que contêm fitoestrogênios em sua composição, que podem causar alterações hormonais a longo prazo, levando ao desenvolvimento de doenças na fase adulta (TOU *et al.*, 1998; TOU *et al.*, 1999; JEFFERSON *et al.*, 2006; TOUSEN *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; RUHLEN *et al.*, 2008; CEDERROTH *et al.*, 2010; TROINA *et al.*, 2010).

2.2.3 COMPONENTES DA SOJA E SUA RELAÇÃO COM A PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

Vários estudos vêm demonstrando que fitoestrogênios presentes em alimentos como a linhaça e a soja, quando consumidos na gestação e na lactação, podem atuar como disruptores de sistemas chave hormonais que controlam o crescimento e o desenvolvimento, devido à atividade estrogênica destes compostos (TOUSEN *et al.*, 2006; RUHLEN *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; TROINA *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

No âmbito desta discussão, é importante ressaltar a capacidade de transferência placentária de fitoestrógenos da mãe para o feto (TODAKA *et al.*, 2005; NAGATA *et al.*, 2006). Nesse sentido, 51 mães Japonesas foram acompanhadas até o momento da cesariana, onde foram coletadas amostra do soro da mãe e do cordão umbilical paralelamente. Foi observada presença de 100% de genisteína, 80% de daizeína e 35% de coumestrol, no soro do cordão umbilical dos recém nascidos (TODAKA *et al.*, 2005). Dentro desta ótica, Nagata *et al.* (2006), também evidenciaram altas correlações para os níveis de isoflavona entre as amostras de sangue maternas e do cordão umbilical das 194 mulheres acompanhadas durante a gravidez (NAGATA *et al.*, 2006).

Ressalta-se ainda, que a exposição à soja ou algum de seus componentes, possa ocorrer no período da lactação, já que foi evidenciada a transferência de fitoestrogênios via leite materno de ratas (FRITZ *et al.*, 1998; TROINA *et al.*, 2010) e no leite humano (FRANKE & CUSTER, 1996).

Cederroth & Nef (2009) evidenciaram que a exposição materna de dieta rica em fitoestrogênios, aproximadamente 25% de proteína de soja, na lactação, diminuiu o peso e a adiposidade corporal, sem influenciar a resposta à tolerância a glicose nos filhotes machos na idade adulta. Já a exposição a essa dieta na gestação não alterou o peso e a adiposidade corporal, mas melhorou a resposta à tolerância a glicose na prole adulta. Assim, é possível que os efeitos metabólicos da soja, sejam dependentes do período da vida em que a exposição ocorre (CEDERROTH & NEF, 2009).

Jahan-mihan *et al* (2011a), demonstraram que filhotes machos, cujas mães foram alimentadas com dieta a base de proteína de soja (200 g/kg de dieta) na gestação, não modificaram a massa corporal ao desmame, no entanto na 9ª semana pós-desmame, esses animais apresentaram aumento da massa corporal e hiperglicemia. Ao desmame, as proles de ambos os grupos foram designadas para receber tanto dieta controle como proteína de soja, sendo observada que a continuação da ingestão de proteína de soja levou ao aumento da glicemia, insulinemia, e índice HOMA-IR, sendo esses parâmetros mais exacerbados quando os filhotes eram nascidos de mães que consumiam esta dieta.

Um segundo experimento foi conduzido, avaliando o efeito do consumo materno de proteína de soja durante a gestação e lactação. Foi observado aumento da glicemia e insulinemia ao desmame. Após o desmame, houve aumento da massa corporal, gordura abdominal, adiposidade central, glicemia e índice HOMA-IR na 15ª semana. A continuação da ingestão da mesma dieta pela prole, não alterou esses parâmetros. Os resultados sugerem que o consumo da proteína de soja quando comparada com o de caseína durante a gestação ou gestação e lactação, aumenta o risco de desenvolver características da síndrome metabólica (JAHAN-MIHAN *et al.*, 2011a).

Filhotes machos de ratas que receberam diferentes concentrações de isoflavonas (0 ppm, 5 ppm, 50 ppm, ou 1000 ppm) durante a gestação e lactação não apresentaram diferença de peso aos 21 e 90 dias de idade. Contudo a concentração de 50 ppm levou ao aumento da leptinemia e adiponectinemia em relação as demais concentrações de isoflavonas, sugerindo um efeito dose dependente. Foi ainda evidenciada a capacidade da adiponectina em atuar sobre células de *Leyding* testiculares, afetando a produção hormonal desses animais (PFAEHLER *et al.*, 2012).

Outros trabalhos apontam o efeito tóxico dos fitoestrógenos sobre a reprodução, podendo causar anormalidade no ciclo estral, e alterações na função ovariana e testicular (TAYLOR *et al.*, 1999; JEFFERSON *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008; CEDERROTH *et al.*, 2010; TROINA *et al.*, 2010). Utilizando culturas de testículos fetais de camundongos, foi demonstrado que a genisteína

é capaz de inibir a secreção de testosterona de células *Leydig* fetais, durante o desenvolvimento fetal precoce (LEHRAIKI *et al.*, 2011).

Por outro lado, Ruhlen *et al.* (2008) demonstraram em camundongos, que a baixa concentração de fitoestrogênios da soja na ração materna durante a gestação e a lactação, promove um aumento de estradiol endógeno, que foi associado com efeitos adversos sobre o sistema reprodutor e sobre o estado nutricional dos filhotes machos na idade adulta, que se tornaram obesos, hiperleptinêmicos e resistentes à insulina. Os animais expostos à dieta rica em fitoestrogênios da soja não desenvolveram estas alterações (RUHLEN *et al.*, 2008).

Condizente com esta ideia, Simmen *et al.* (2010) evidenciaram que o consumo materno de 20% de proteína isolada de soja na gestação e na lactação e a continuação pela prole até 48 dias de vida, aumentou a expressão do receptor do hormônio tireóideo (TR β 1), bem como a expressão e a atividade das iodotironinas desidases (D1 e D2) no fígado de ratos, sendo sugerido que esses efeitos mediam a ação dos hormônios tireóideos, contribuindo para redução de colesterol sérico, da esteatose hepática e do peso corporal (SIMMEN *et al.*, 2010).

Outros estudos têm demonstrado efeitos benéficos do consumo de proteína isolada de soja durante a gestação e lactação, levando a redução do peso corporal, melhora da sensibilidade a insulina, redução da glicemia e dos níveis de colesterol total e triglicérides na progênie adulta (CEDERROTH *et al.*, 2008, CEDERROTH *et al.*, 2009; SIMMEN *et al.*, 2010). No entanto, há divergências na literatura, e poucos estudos avaliam o consumo do alimento soja propriamente dito, sobre parâmetros endócrino-metabólicos, em especial sobre a função da tireoide.

2.3 SÍNTESE, SECREÇÃO E METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

A glândula tireoide é muito importante no controle de diversas funções do organismo, incluindo a termogênese, crescimento, desenvolvimento e metabolismo energético. Esta regulação ocorre através da produção dos hormônios tireoidianos, T4 (Tiroxina) e T3 (Triiodotironina), caracterizados por conter iodo na sua constituição, conforme a figura 3.

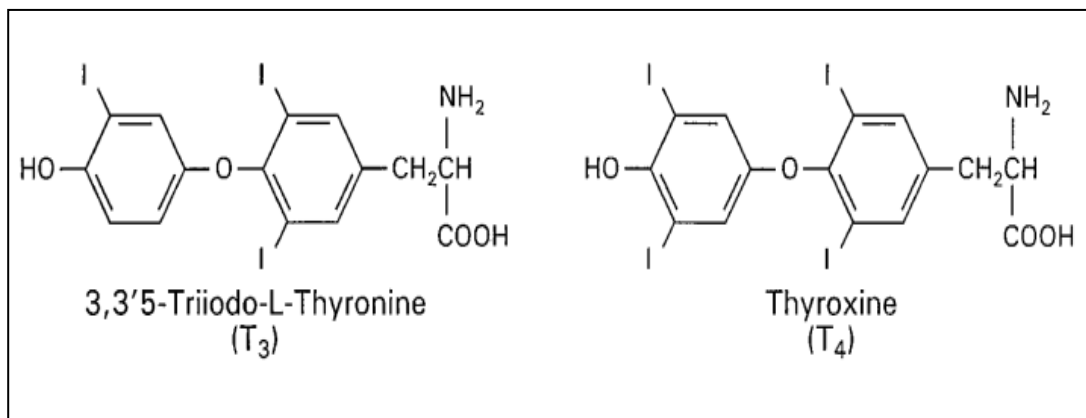


Figura 3: Estrutura química dos hormônios tireoidianos. Fonte: Yen, 2001.

A regulação inicial da produção dos hormônios tireoidianos envolve sua diminuição na corrente sanguínea, e o eixo hipotálamo – hipófise. O hipotálamo libera o hormônio liberador da tireotrofina (TRH), que induz a adeno-hipófise a liberar a tireotrofina (TSH), que por sua vez, estimula a síntese e liberação de T3 e T4, que quando aumentados, induzem o mecanismo de *feedback* negativo, inibindo a secreção de TRH e o TSH (WAJNER *et al.*, 2008).

O estímulo inicial envolvendo o sistema nervoso, induz a entrada de iodeto na glândula, que é oxidado pela ação da enzima peroxidase tireóidea (TPO) formando o iodo complementar. Posteriormente o iodo é passado para o interior do colóide (material glicoproteico onde os hormônios ficam armazenados) onde se une com a proteína tireoglobulina (Tgb) por acoplamento oxidativo, iniciando a iodação dos grupos tirosil, levando a formação da monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT), que ao se acoplarem originam o T3 ou T4. Ocorre um processo de fagocitose na membrana citoplasmática, resultando em endocitose dos complexos Tgb + T3 e Tgb + T4 e conseqüente desacoplamento do complexo, liberando T3, T4 e iodotirosina que é clivada pela enzima desiodase, liberando DIT, MIT e iodetos

que são reciclados (YEN, 2001). Esse complexo mecanismo é evidenciado na figura 4.

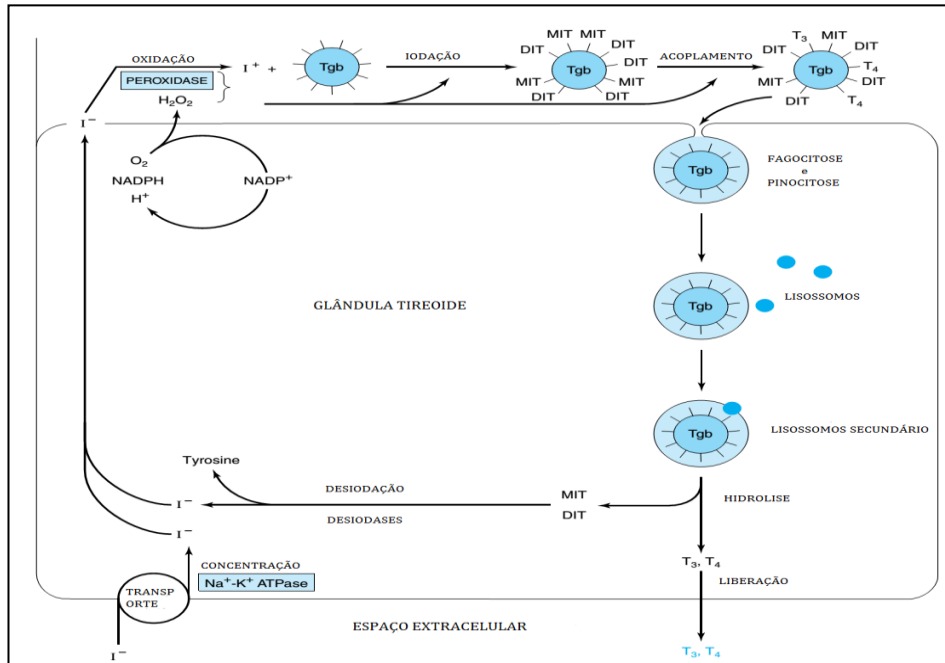


Figura 4: Síntese e Liberação dos hormônios tireoidianos envolvendo o iodo. Tireoglobulina (Tgb), Moniodotirosina (MIT), Diiodotirosina (DIT), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂). Fonte: Adaptado de Murray *et al.*, 2003.

Os hormônios produzidos são liberados na corrente sanguínea, onde a maior parte se liga de forma reversível às proteínas transportadoras, denominadas de TBG (globulina ligadora de tiroxina), TBPA (pré-albumina ligadora de tiroxina) e albumina. Uma pequena proporção desses hormônios circula livremente (0,03% de T₄ e 0,03% de T₃), e são capazes de regular as secreções pela tireoide, determinar o estado tireoidiano do indivíduo e exercer as ações fisiológicas (LOPES, 2002). Quando necessário há o desacoplamento da proteína transportadora e disponibilização do T₃ e T₄ livre para as células. A tabela 3 resume as principais características relacionadas à produção e transporte destes hormônios.

Tabela 3: Diferenças na síntese e transporte de T3 e T4

	T3	T4
Concentração sérica total	50 – 210 ng/dL	4,5 – 13,0 µg/dL
Concentração sérica livre	0,4 – 1,3 ng/dL	0,7 – 2,2 ng/dL
% ligado a proteína	0,2 – 0,5 %	0,03 – 0,05%
Meia vida	1,5 – 3,0 dias	7 – 9 dias
Produção diária	30 µg/dL	80 µg/dL
Transporte	TBG ~100% TBPA (muito pouco)	TBG ~75% TBPA ~15% Albumina ~10%
Ligação ao receptor celular	T3 tem uma afinidade pelos receptores celulares de 10 a 15 vezes maior que o T4.	

Fonte: Adaptado de Lopes, 2002; Bianco & Kim, 2006

Ressalta-se que o T4 é produzido exclusivamente pela glândula tireoidiana (80 µg), enquanto cerca de 80% do T3, pode derivar da desiodação do T4 intracelularmente em tecidos não tireoidianos como o fígado e rim. Nota-se que o T3 é considerado a forma biologicamente mais ativa, por possuir uma afinidade de 10 a 15 vezes maior pelos receptores nucleares que o T4, considerado um pró-hormônio (BIANCO & KIM, 2006).

Dessa forma, a homeostasia desses hormônios, principalmente do T3, é dependente da regulação das desiodases, que se dividem em 3 isoenzimas diferentes: a do tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) e tipo 3 (D3). Esta reação é caracterizada pela retirada do iodo e pode ocorrer tanto em nível do anel fenólico (5'-desiodação), como em nível anel tirosílico (5-desiodação). A primeira via é considerada a via biotivadora, sendo a única capaz de gerar o T3.

Já a reação 5-desiodação forma o T3 reverso (rT3) e diiodotirosinas (T2), que são considerados metabolicamente inativos (figura 5). Essas vias são consideradas importantes para a degradação e remoção dos hormônios tireoidianos da circulação, pois somente uma quantidade mínima destes é liberada pela urina (KIMURA, 2012).

A enzima D1 está presente principalmente no fígado, rim e tireoide, sendo responsável por catalisar a desiodação de T4 e rT3, formando o T3 e 3,3' T2, e constitui importante fonte de T3 plasmático. Em relação à enzima D2, esta vem sendo apontada como responsável pela reação da 5-desiodação, levando a formação de T4 a rT3 e do rT3 a T2. Contudo alguns estudos em roedores já evidenciam que essa pode ter participação na formação do T3 plasmático, normalizando seus níveis em fase posterior a atuação de D1 (DUTRA, 2002). Ao contrário da D1 encontra-se em baixas concentrações no rim, mas já foi evidenciada em diversos órgãos (BIANCO *et al.*, 2002).

Por fim a D3, é apontada como mais importante na degradação de T3 e inativação do T4. Assim como a D2, participa da retirada de iodo do anel tirosílico do T4 e T3, formando rT3 e T2. Em relação sua distribuição no organismo, se encontra preferencialmente no SNC, pele e placenta dos animais adultos; No período neonatal, há uma predominância no músculo esquelético, fígado e intestino.

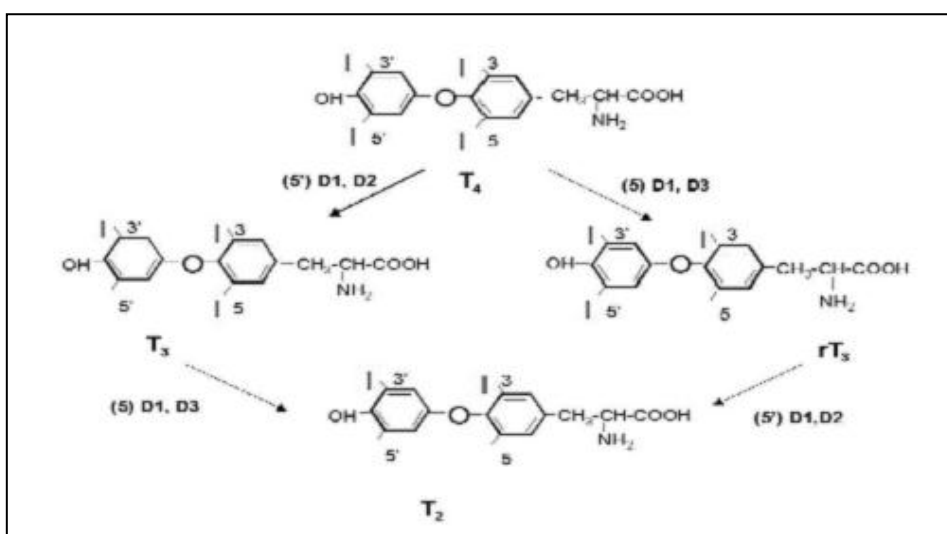


Figura 5: Atuação das enzimas desiodases. Fonte: Meyer *et al.*, 2007.

2.3.1 EFEITO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NO ORGANISMO

A ação dos hormônios tireoidianos sobre o organismo ocorre principalmente pela interação com receptores tireoidianos (TR), que se encontram ligados a genes alvos em regiões específicas do DNA conhecidas como ERTs (elemento responsivos do hormônio tireoidiano). Quando T3 se une ao TR, ocorre uma alteração conformacional, induzindo a transcrição gênica, desencadeando os efeitos tireoidianos sobre os órgãos e sistemas. É importante ressaltar que os TR derivam de 2 genes distintos, o α e o β , que por sua vez geram as isoformas ativas $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\beta 2$ (ZHANG & LAZAR, 2000).

Poucos efeitos desses hormônios podem ocorrer em nível de membrana plasmática e mitocondrial, sem que haja interação com os TR, sendo observado neste caso uma maior atuação do T4. Esta ligação não genômica vem sendo apontada como importante para o rápido aumento na atividade das calmodulinas e dos transportadores iônicos nas células musculares e cardíacas; aumento da captação de glicose, controle do transporte de cálcio e da remodelação da actina (KIMURA, 2012).

Haja vista a ampla existência dos receptores desses hormônios em todo o organismo, nota-se a sua importância na função celular, modulando as rotas metabólicas através de mudanças no consumo de oxigênio e no metabolismo dos macronutrientes e vitaminas. Podendo ainda atuar diretamente na expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo, e assim, afetar a síntese e a degradação de outros hormônios (LUNARDELLI *et al.*, 2007). A atuação fisiológica desses hormônios sobre o organismo é apresentada na tabela 4.

Tabela 4: Funções fisiológicas dos hormônios tireoidianos

Molécula ou Tecido Alvo	Função	Ação fisiológica
Ácidos graxos	Metabolismo	Síntese e degradação de colesterol Síntese de receptores de LDL
Carboidrato	Metabolismo	Estimula a gliconeogênese, glicogenólise e incorporação da glicose nas células

Proteína	Metabolismo	Síntese e proteólise
Coração	Cronotrópico	Potencializa a ação dos receptores β adrenérgicos
	Inotrópico	Aumenta a resposta das catecolaminas Aumenta as miosinas de maior atividade ATPase
Gastrointestinal	Metabolismo	Aumenta o apetite, a ingestão de alimentos, secreção dos sucos digestivos e a motilidade gastrointestinal
Músculo esquelético e tecido adiposo marrom	Metabolismo	Estimula a termogênese obrigatória e facultativa
Osso	Desenvolvimento e remodelação	Crescimento normal e maturação Síntese e reabsorção óssea
Reprodução	Desenvolvimento	Pode parar o desenvolvimento fetal
Respiração	Metabolismo	Intensifica a utilização de oxigênio e a formação de dióxido de carbono
Sistema Nervoso	Desenvolvimento	Atua no desenvolvimento normal do SNC
Tecido Adiposo	Diferenciação e catabolismo	Maturação de pré-adipócitos em adipócitos Estimula a lipogênese

Fonte: Adaptado de Kimura, 2012

Dessa forma, evidencia-se a importância dos hormônios tireoidianos para o crescimento e o desenvolvimento normal do organismo, sendo importante elucidar os efeitos de alterações nas concentrações dos hormônios tireoidianos em fases críticas do desenvolvimento.

2.3.2 COMPONENTES DA SOJA E FUNÇÃO TIREOIDIANA

Vários estudos têm investigado o efeito da soja e de seus constituintes sobre a função tireoidiana. Nesse aspecto, tem sido observada interferência na utilização de iodo e inibição da atividade da TPO com o consumo de soja ou de seus componentes isolados (IKEDA *et al.*, 2000; CHANG & DOERGE, 2000; DOERGE & CHANG, 2002). É sugerido que essas alterações parecem ter importância clínica somente quando associadas à deficiência de iodo (KAJIYA *et al.*, 2005; IKEDA *et al.*, 2000). Em relação ao efeito sobre os níveis séricos

dos hormônios tireóideos, alguns estudos mostram aumento (FORSYTHE, 1995; KAVANAGH *et al.*, 2008) outros diminuição (KAJIYA *et al.*, 2005) ou nenhuma alteração (CHANG & DOERGE, 2000).

Estudo realizado com ratos machos orquiectomizados, que receberam dieta a base de isoflavonas de soja (genisteína e daizeína), observou aumento dos níveis de TSH na hipófise e alterações micro-foliculares nos tecidos tireoidianos, acompanhada de níveis séricos reduzidos de T3 e T4 totais (SOSIĆ-JURJEVIĆ *et al.*, 2012). A fim de avaliar a expressão de genes envolvidos no eixo hipotálamo – tireoide, uma nova pesquisa foi conduzida, observando-se uma menor regulação da expressão do mRNA da tireoglobulina e da TPO, sem alterar mRNA de D1 na glândula tireoide; maior expressão de mRNA de D1 no fígado; diminuição do mRNA D1 e aumento de TSH na hipófise. Não houve alteração nas concentrações de T4 na tireoide, entretanto seus níveis séricos estavam diminuídos. Perante esses achados, os autores sugerem que a supressão direta da função tireoidiana não é o principal mecanismo envolvido na ação das isoflavonas (SOSIĆ-JURJEVIĆ *et al.*, 2014).

Nesse aspecto, em seus artigos de revisão, Santos *et al.* (2011) e Doerge e Change (2002), apontaram o papel dos flavonóides sobre a tireoide, demonstrando a capacidade destes em inibir a atividade da peroxidase tireóidea, diminuindo a síntese hormonal (SANTOS *et al.*, 2011; DOERGE & CHANGE, 2002). Além disso, estes compostos podem atuar sobre a disponibilidade de T3 para os tecidos, uma vez que agem inibindo a atividade das desidases ou deslocando o T4 da transtirretina (SANTOS *et al.*, 2011).

Estudo avaliando o efeito da PIS e das isoflavonas sobre os receptores dos hormônios tireoidianos (TR), demonstrou que o extrato de PIS levou a *upregulation* da expressão de TR β 1 hepáticos em ratos de ambos os sexos, sem levar a alteração na expressão de TR α 1, TR α 2, TR β 2 e nas concentrações de T3 e T4 no plasma. A suplementação da dieta a base de PIS com isoflavonas, aumentou o nível de T4 em ratos fêmeas, sem alterá-lo nos machos, e reduziu o nível de TR α 1 hepáticos em ratos jovens com 28 dias, mas não em idade posterior. O presente estudo sugere que a expressão hepática de TR β 1 pela PIS, pode ser um dos mecanismos pelo qual a soja

regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol e lipídeo, levando a diminuição de suas concentrações na corrente sanguínea (XIAO, 2004).

2.3.3 COMPONENTES DA SOJA E PROGRAMAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA

Estudos clínicos e experimentais têm fornecido evidências de mudanças ocorridas em pontos de ajuste homeostático para muitos hormônios e alterações na sensibilidade dos tecidos a esses hormônios. Alterações fetais no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, responsáveis por controlar o balanço energético entre outras funções, podem ser um importante mecanismo pelo qual as exposições durante o período de desenvolvimento, afetam as respostas subsequentes da prole na idade adulta (KOLETZKO *et al.*, 2011).

Nesse sentido, vários trabalhos vêm demonstrando programação da função da tireoide por alterações nutricionais ou hormonais maternas na lactação. Ramos *et al.* (1997), demonstraram que a prole de ratas lactantes recebendo uma dieta com baixo teor de proteína (8%), apresentaram alteração na função tireoidiana, com diminuição significativa do nível de T3 aos 21 dias, sugerindo o desenvolvimento de hipotireoidismo. Já na fase adulta houve restabelecimento dos níveis de T3, e aumento da glândula tireoide provavelmente por um mecanismo compensatório (RAMOS *et al.*, 1997).

No âmbito desta discussão, outros estudos têm demonstrado o papel da desnutrição, programando a prole para disfunção da tireoide, com modificação dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos e da resposta ao TRH e TSH (PASSOS, 2001; DUTRA, 2002; LISBOA *et al.*, 2008). Além disso é sugerida a alteração na atividade das desidases em vários tecidos (DUTRA, 2002; LISBOA *et al.*, 2003; LISBOA *et al.*, 2008).

Outra evidência importante é que alterações hormonais durante o período da lactação, também levam à disfunção da tireoide. Nesse aspecto, animais programados com hiperleptinemia nos 10 primeiros dias de lactação apresentaram alteração da função tireoidiana, com diminuição dos níveis de T3

aos 30 dias de idade, níveis normais de TSH e menor atividade de alpha-glicerofostato desidrogenase mitocondrial (GPDm) hepática, desenvolvendo hipotireoidismo. Já aos 150 dias esses animais apresentaram aumento de T3 e T4 sérico com supressão de TSH, sugerindo hipertireoidismo primário (TOSTE *et al.*, 2006b). Além disso, aos 30 dias de idade, apesar de uma hiperleptinemia, há uma resistência a ação desse hormônio sobre a tireoide e o hipótalamo, confirmada pela menor expressão de seus receptores (DUTRA, 2007)

Em relação aos efeitos da exposição precoce à soja e seus componentes em períodos críticos do desenvolvimento sobre a função tireoidiana, os estudos são ainda escassos, apesar das evidências do efeito bociogênico da soja e seus componentes (FORT *et al.*, 1990; CHORAZY *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 2000)

Recentemente, foi demonstrado que o consumo materno de 20% de proteína de soja na gestação e na lactação e a continuação pela prole até 48 dias de vida, aumentou a expressão do receptor do hormônio tireóideo (TR β 1), bem como a expressão e a atividade das iodotironinas desiodases (D1 e D2) no fígado de ratos. É sugerido que esses efeitos medeiam a ação dos hormônios tireóideos, contribuindo para redução de colesterol sérico, da esteatose hepática e do peso corporal. Ressalta-se que a quantidade de proteína de soja utilizada neste estudo contém concentrações de fitoestrogênios semelhantes às encontradas no soro de humanos que consomem regularmente soja (SIMMEN *et al.*, 2010).

Figueiredo *et al.* (2011) também evidenciaram alterações na função tireóidea e no metabolismo dos hormônios tireóideos na prole de ratas que receberam dieta rica em linhaça (25%) na lactação. Ao desmame, os filhotes machos apresentaram concentrações séricas baixa da Triiodotironina (T3) e alta de TSH, com menor atividade D1 hepática, caracterizando hipotireoidismo. Na idade adulta, estes animais foram programados para menor T4 sérico, menor atividade das desiodases tireóideas e maior atividade da D2 no tecido adiposo marrom (TAM) (FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

Mediante tudo o que foi abordado, nota-se a necessidade de mais estudos que avaliem o efeito da soja sobre a função da tireoide, uma vez que já é comprovada a capacidade dos fitoestrogênios causarem alterações na sua função, e que o estado metabólico durante a programação, também exerce efeito nessa glândula. Ressalta-se ainda, que não são conhecidos os efeitos do consumo materno de soja somente no período da lactação sobre a função tireóidea da prole na idade adulta. Sendo essa glândula de suma importância para o funcionamento adequado do organismo, uma vez que participa de várias vias metabólicas e controle de várias funções de sistemas diversos do organismo, esse estudo será de grande relevância não só para a compreensão de fatores nutricionais que podem interferir na função da tireoide, como também elucidar fatores que possam atuar na regulação desta glândula.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do consumo de soja e de proteína isolada de soja por ratas durante a lactação sobre o estado nutricional, parâmetros metabólicos e hormonais da prole na idade adulta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nas ratas lactantes que receberam dieta a base de soja e proteína isolada de soja, foram avaliados:

- o estado nutricional (ingestão alimentar, massa corporal, adiposidade central, concentrações séricas de proteínas totais e albumina);
- o conteúdo de proteína, colesterol total, triglicérido e leptina no leite (21^o dia)
- o perfil lipídico (colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol e triglicérido) e a glicemia ao final da lactação;
- o perfil hormonal (17- β estradiol, T3, T4 e insulina) ao final da lactação.

Nos filhotes machos cujas mães receberam ração a base soja e de proteína isolada de soja na lactação, foram avaliados aos 21 e 150 dias de idade:

- o estado nutricional (ingestão alimentar, massa e composição corporais, adiposidade central e concentrações séricas de proteínas totais e albumina);
- o perfil lipídico (colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol e triglicérido) e a glicemia;
- o perfil hormonal (insulina, leptina, T3 e T4);

4. METODOLOGIA

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental usado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF (Parecer nº 030/2011). Ratas *Wistar* (3 meses) e a prole macho, advindos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF no primeiro dia após o nascimento, foram mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNE), do Departamento de Nutrição da UFJF, com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00h-19:00h) controlados. A avaliação do consumo de soja e de proteína isolada de soja durante a lactação, foi realizada em dois experimentos independentes, porém conduzidos simultaneamente, conforme descritos abaixo.

Modelo Experimental 1:

1- Grupo Controle Caseína (C): livre acesso a dieta a base de caseína (% do valor energético: 18,5% de proteína, 63,5% de carboidrato, 17,8% de lipídeo);

2- Grupo Soja (S): livre acesso a dieta a base de farinha de soja orgânica como fonte proteica (% do valor energético: 18,3% de proteína, 43,5% de carboidrato, 38,1% de lipídeo).

3- Grupo Controle Soja (CS): livre acesso a dieta a base de caseína, porém com quantidade semelhante de lipídeos do grupo soja (% do valor energético: 17,8% de proteína, 45,5% de carboidrato, 36,8% de lipídeos).

Modelo Experimental 2:

1- Grupo Controle Caseína (C): livre acesso a dieta a base de caseína (% do valor energético: 18,5% de proteína, 63,5% de carboidrato, 17,8% de lipídeo);

2- Grupo Proteína Isolada de Soja (PIS): livre acesso a dieta a base de proteína isolada de soja (% do valor energético: 20,3% de proteína, 62,1% de carboidrato e 17,4% de lipídeos).

Cabe ressaltar, que nos dois modelos experimentais utilizou-se o mesmo grupo controle caseína, já que os experimentos ocorreram simultaneamente. O grupo CS foi incluído no modelo experimental 1, pois ao analisar a composição nutricional da farinha de soja, verificou-se que esta apresentava alto conteúdo de lipídeos (29,24%). Desta forma, ao adicionar a quantidade de farinha de soja necessária para equiparar a quantidade de proteína à ração do grupo caseína, verificou-se que a ração do grupo Soja, ficava hiperlipídica, o que poderia influenciar na interpretação dos resultados, em especial nos parâmetros metabólicos.

Para cada grupo foram estudadas 6 ratas lactantes (6 ninhadas), com 6 filhotes machos em cada ninhada, número de animais que confere maior potencial lactotrófico (Fishbeck & Rasmussen, 1987), perfazendo um total de 36 filhotes por grupo. Ao desmame (21 dias), 3 filhotes de cada ninhada foram randomicamente selecionados e colocados em gaiolas individuais com livre acesso a água e a ração comercial até os 150 dias de idade (n=18). O restante das proles (n=18), juntamente com suas mães, após jejum de 8 horas, foram anestesiados com *Ketamina* (90 mg/kg de peso corporal, i.p.) e *Xilazina* (10 mg/Kg peso corporal, i.p.), sendo o sangue coletado por punção cardíaca e a eutanásia completada com o rompimento do diafragma. As proles mantidas até os 150 dias de idade foram eutanasiadas de forma semelhante, após jejum de 8 horas. O sangue coletado foi centrifugado (3500 rpm por 15 minutos) para obtenção do soro, que foi armazenado em freezer a -80°C até a realização das análises. Foram excisados e pesados os seguintes tecidos: fígado, tireóide, tecidos adiposos (epididimal, subcutâneo e retroperitoneal) e carcaça que foram armazenados em freezer a -80°C.

4.2 RAÇÕES EXPERIMENTAIS

Para confecção da ração a base de soja, utilizou-se soja orgânica comprada no comércio local. Inicialmente realizou-se o preparo da farinha de soja. A fim de inibir fatores anti-nutricionais, os grãos de soja foram selecionados manualmente, pesados e colocados em estufa ventilada a 60°C por 30 minutos. Para extração da casca, a soja foi colocada em água fervente durante 3 minutos, e deixada de molho em água limpa por 4 horas. A água foi desprezada e os grãos colocados para cocção em panela de pressão durante 30 minutos. Após o cozimento, os grãos foram colocados em estufa ventilada a 60°C até a secagem, e na sequência moídos (Soares *et al.*, 2005).

Posteriormente, avaliou-se a composição centesimal da farinha de soja obtida por métodos já padronizados, onde foram mensurados o extrato etéreo por extrator de Soxhlet; as proteínas por método de Micro-Kjeldahl; os carboidratos Fração Nifext; o teor de minerais por gravimetria, utilizando-se mufla; e a umidade por gravimetria em estufa (105°C) (AOAC, 1984) (Tabela 5). Os dados obtidos foram utilizados para calcular a dieta a base de soja, sendo que os conteúdos de proteína, lipídios e fibras foram corrigidos para os teores presentes na farinha de soja.

Para a confecção da dieta a base de PIS, utilizou-se produto obtido no comércio local; e para a dieta a base de caseína (grupos C e CS), foi utilizada a caseína (teor proteico: 80%, RHOSTER, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). As dietas foram preparadas manualmente no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFJF, sendo adicionadas as misturas de minerais e vitaminas, formuladas conforme a recomendação do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M) para roedores. Os ingredientes das rações (Tabela 6) foram pesados e homogeneizados em batedeira, com água fervente. A massa obtida, transformada em pellets e seca em estufa ventilada a 50°C por 24 h, e após a identificação, congelada e armazenada em freezer a -4°C. A composição centesimal das dietas depois de prontas, foi feita pelos mesmos métodos utilizados na análise da soja já descritos acima. A dietas foram isocalóricas (Tabela 6).

No estudo não foi possível analisar a quantidade de isoflavonas presente na dieta, porém foi feita a estimativa de acordo com o conteúdo de isoflavonas

na farinha de soja e PIS descrita na literatura. De acordo com Barbosa *et al* (2006), 100 gramas de farinha de soja integral contém 200 mg de isoflavonas, enquanto que 100 gramas de proteína isolada de soja tem 124 mg de isoflavonas. A partir da quantidade de farinha de soja e proteína isolada de soja adicionada na ração, foi estimada 108 mg de isoflavonas na dieta do grupo S e 24,8 mg no grupo PIS por 100 g de dieta.

Tabela 5: Composição centesimal da soja orgânica utilizada na confecção da ração do grupo soja

Composição da Soja	%
Proteína	36,94
Carboidrato	26,30
Lipídeo	29,24
Cinzas	2,79
Umidade	4,73

Tabela 6: Composição das dietas dos grupos experimentais

Ingredientes (g/100g)	Controle Caseína	Controle Soja	Soja	Proteína Isolada de Soja
Caseína ¹	20	20	-	-
Farinha de Soja ²	-	-	54	-
Proteína Isolada de Soja ³	-	-	-	20
Amido de Milho	39,7	29,4	12	39,7
Amido ⁴ dextrinizado ¹	13,2	6,6	13,2	13,2
Sacarose	10	10	10	10
Celulose ¹	5	5	3,9	5
Óleo de Soja ⁵	7	14,9	2,8	7
Mix Mineral ¹	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix Vitamina ¹	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cisteína ¹	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina ¹	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT ¹	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
Macronutrientes Composição (g/100g)				
Proteína	16,34	16,24	20,12	18,34
Carboidrato	56,02	41,30	47,80	56,02
Lipídeos	7,0	14,9	18,58	7,0
Total de energia (kcal/100g)	394,6	398,10	425,2	394,6

¹Ingredientes adquiridos da RHOSTER (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil); ²Marca Jasmine (Curitiba, PR, Brasil); ³Marca Nutrisoy Alimentos (Colombo, PR, Brasil); ⁴Marca Milhena; ⁵Marca Leve

4.3 EXTRAÇÃO DE LEITE E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA NO LEITE

Ao final da lactação (21^o dia), as ratas foram separadas de seus filhotes, e após 120 minutos receberam injeção de 1 ml de ocitocina (Eurofarma, SP, BR) na dose de 5UI (Passos *et al*, 2001). O leite foi extraído manualmente, 15 minutos após a administração da ocitocina, das 12 glândulas mamárias (inguinais e peitorais), estando as lactantes anestesiadas com *Ketamina* (90 mg/kg de peso corporal, i.p.) e *Xilazina* (10 mg/Kg peso corporal, i.p.). As amostras de leite foram armazenadas no freezer a – 20°C até a avaliação do conteúdo de proteína, colesterol total, triglicerídeos e leptina.

Para determinação da quantidade de proteína do leite foi utilizado o método de Peterson (1977). As amostras de leite foram diluídas (1:10) em água destilada. Uma alíquota de 100 µl foi acondicionada em tubo de ensaio com o mesmo volume de DOC 0,15% (Sigma, MO, USA) e de TCA 72% (Sigma, MO, USA), agitados em vórtex, mantidos em repouso por 10 minutos e centrifugados (3000xg/40 minutos). Esta fase de precipitação é necessária para a remoção de substâncias interferentes. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de água destilada sob agitação. Foi adicionado 1 ml do reativo A (CTC / SDS 10% / NaOH 3,2% / água destilada na proporção 1:1:1:1), agitado e mantido a temperatura ambiente por 10 minutos. Foi acrescentado 0,5 ml de reativo B (reativo de Folin diluído em água destilada na relação de 1:5), imediatamente agitado em vórtex e mantido em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm. O BSA foi utilizado como padrão em alíquotas equivalentes a 10 e 100 mg de proteína. As concentrações de proteína no leite foram calculadas a partir da equação de Stauffer (1975), e os resultados expressos em mg/mL.

4.4 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

O consumo de ração e a massa corporal das ratas lactantes foram monitorados diariamente por toda a lactação (21 dias). Os filhotes, após o desmame até o dia da eutanásia (150 dias), tiveram o consumo de ração e a massa corporal aferidos de 4 em 4 dias.

A estimativa da adiposidade central foi avaliada pela pesagem e somatório das gorduras das regiões subcutânea, epididimal e retroperitoneal.

A composição corporal foi avaliada pelo método da carcaça. As carcaças foram amolecidas em autoclave durante 1 hora e homogeneizadas em liquidificador com água destilada na proporção de 1:1, sendo separada uma alíquota de cada amostra e colocada em estufa para obtenção do material seco utilizado nas análises. As diluições foram corrigidas (Toste *et al.*,2006a). Os conteúdos de umidade, cinzas, proteína e lipídeos foram determinados em triplicata no Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG, Brasil), de acordo com métodos de referência (AOAC, 2000). O conteúdo de proteína foi quantificado, usando o método de Kjeldahl (AOAC, 2000) com o equipamento Foss (modelo Kjeltec 8400, Foss, Hillerød, Dinamarca) e o conteúdo de lipídeo foi determinado usando o procedimento Ankom com extrator Ankom (modelo XT10, Ankom Technology, Nova York, USA).

4.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Albumina e proteína total foram dosadas no soro das mães e dos filhotes aos 21 e 150 dias utilizando analisador automático Labmax 560 seguindo recomendações das bulas dos kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). Os resultados foram expressos em g/dL.

A glicemia foi medida antes da anestesia dos animais e após jejum de 8 horas, a partir de amostra de sangue coletada da veia caudal, e com auxílio de um medidor automático (ACCU CHECK-Active, Roche®), que se baseia na reação da glicose-oxidase. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6 PERFIL LIPÍDICO

Níveis séricos de colesterol total (CT), colesterol HDL e triglicerídeos (TG) foram determinados utilizando analisador automático Labmax 560, seguindo recomendações das bulas dos kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). O colesterol LDL foi calculado através da fórmula de Friedewald (Friedewald & Levy, 1972): $LDL-c \text{ (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{Triglicerídeos}/5) - HDL-c$. O CT e TG também foram medidos no leite das ratas lactantes através de método enzimático colorimétrico utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). Para dosagem de TG, o leite foi diluído (1:25). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.7 DOSAGENS HORMONAIS

A insulina sérica foi dosada por radioimunoensaio (RIA) utilizando Kit comercial específico (ImmuChem™ Coated Tube, MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, USA) com coeficiente de variação intra-ensaio de 3,2% e sensibilidade de 0,1 ng/dL. Os resultados foram expressos em uIU/mL.

O 17 β-estradiol sérico das mães foi avaliado por RIA utilizando kit comercial específico (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostics Division, Costa Mesa, CA), com coeficiente de variação intra-ensaio de 5,5% com sensibilidade de 10 pg/mL. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Os hormônios tireoidianos, T4 livre (T4L) e T3 total (T3T), também foram mensurados por RIA usando Kits comerciais específicos (MP biomedical, Diagnostics Division, New York, USA). O coeficiente de variação intra-ensaio de T3 foi de 5,6% e de T4 3,9% com sensibilidade de 6,7 ng/dL e 0,045 ng/dL, respectivamente. Os resultados foram expressos em ng/mL.

A leptina foi dosada no soro das proles e no leite das mães por ELISA, utilizando Kit comercial (Rat leptina, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) com coeficiente de variação intra-ensaio de 2,49% e sensibilidade 0,08 ng/mL. Os resultados foram expressos em ng/mL.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 5 e expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram determinadas através do teste *t student* para o grupo C vs PIS e análise de variância ANOVA one-way com pós- teste de Newman-Keuls para os grupos C vs CS vs S. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 MODELO EXPERIMENTAL 1 – EFEITOS DO ALIMENTO SOJA

5.1.1 ESTADO NUTRICIONAL DAS RATAS LACTANTES

Ratas lactantes que consumiram soja durante a lactação apresentaram aumento esporádico na ingestão alimentar (Figura 6A) (Dias 3, 18, 19 vs C e CS; dia 4 vs CS), mas não modificaram a sua massa corporal (Figura 6B) e a adiposidade central (Figura 6C). Em relação às concentrações séricas de proteína total e albumina não observamos alteração com o consumo de soja na lactação (Figuras 7A e 7B).

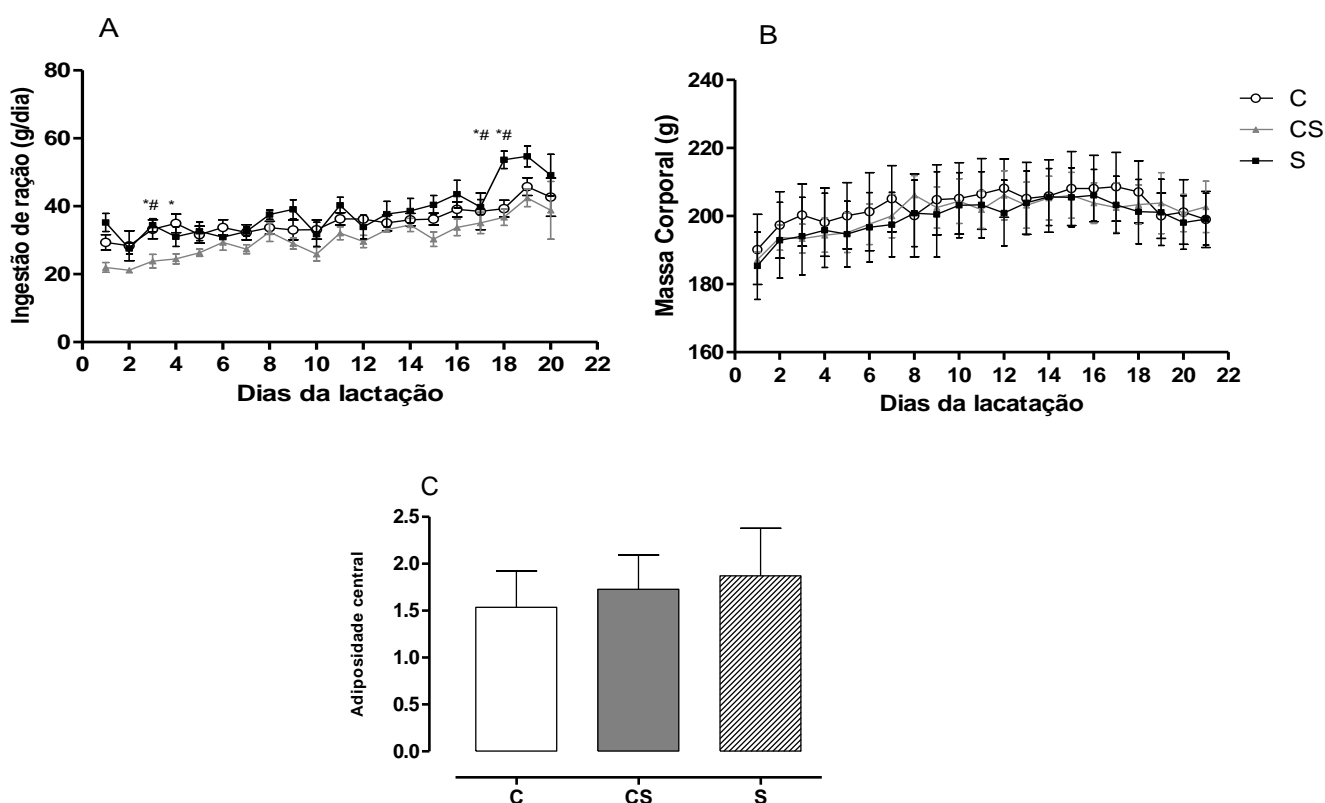


Figura 6: Consumo diário de ração (A), massa corporal (B) e adiposidade central das ratas lactantes que receberam dieta Controle (C), Controle Soja (CS) e Soja (S). Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais em cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ S vs C. # $p < 0,05$ S vs CS.

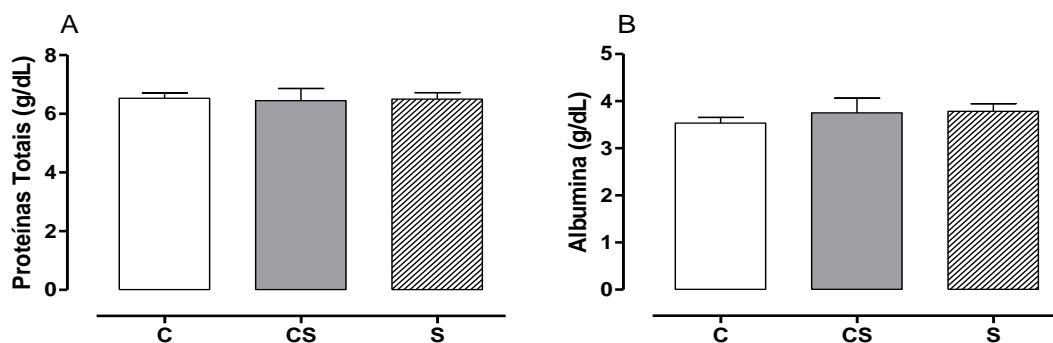


Figura 7: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) das ratas lactantes que receberam dieta Controle (C), Controle Soja (CS) e Soja (S) ao final da lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm.

5.1.2 CONTEÚDO DE PROTEÍNA, COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEO E LEPTINA DO LEITE DAS RATAS LACTANTES

Ao analisarmos o leite das ratas do grupo S, observamos uma redução significativa do conteúdo de CT no grupo S em relação ao C (-44,52%, $p < 0,0001$) e CS (-37,36%, $p < 0,0001$), e do CS versus C (-32, 25, $p < 0,0001$). Os níveis de TG também foram menores no grupo S versus C (65,06%, $p < 0,0001$) e CS (-24,05%, $p < 0,0001$). O conteúdo de proteína e leptina não sofreu alteração.

Tabela 7: Conteúdo de Proteína, Colesterol total, Triglicerídeos e Leptina do leite das ratas que consumiram S durante a lactação

	C	CS	S
Proteína (g/dL)	10,56 \pm 1,72	9,471 \pm 0,88	10,59 \pm 0,89
Colesterol Total (mg/dL)	734.3 \pm 22,27	428.9 \pm 26,51*	280,8 \pm 22,39**
Triglicerídeos (mg/dL)	554,9 \pm 71,17	459,9 \pm 11,54	227,2 \pm 24,70**
Leptina (ng/mL)	1,48 \pm 0,07	1,36 \pm 0,06	1,32 \pm 0,09

Valores expressos como média \pm epm de 6 animais por grupo. C: controle caseína; CS: controle soja; S: soja. * vs C; # vs CS ($p < 0,05$)

5.1.3 PERFIL HORMONAL E METABÓLICO AO DESMAME DAS RATAS LACTANTES

As ratas lactantes que consumiram S apresentaram aumento de T4L em relação aos controles (C: +51,5%, $p < 0,02$ e CS:+ 88,9%, $p < 0,02$), e diminuição do 17 β -estradiol (C= - 41,6%; CS= - 38,3%, $p < 0,002$), sem alterar T3T, insulinemia e glicemia (tabela 8).

O CT sérico das ratas S foi menor quando comparadas com o CS (-14,96%, $p < 0,0016$), porém maior em relação ao C (+19,8%, $p < 0,0016$). As ratas do grupo CS também apresentaram aumento deste parâmetro em comparação ao grupo C (+40,9%, $p < 0,0016$). O LDL colesterol das ratas S foi menor (-30,2%, $p < 0,002$) apenas quando comparado com o CS. Já as ratas CS apresentaram LDL colesterol maior que o C (+83,2%, $p < 0,0025$), sem alterar o colesterol HDL. O TG sérico foi menor nas ratas S somente em comparação as ratas C (-37,3, $p < 0,026$) (tabela 8).

Tabela 8: Perfil hormonal, homeostase glicêmica e perfil lipídico das ratas dos grupos controle, controle soja e soja

	C	CS	S
Perfil hormonal			
T4 Livre (ng/mL)	0,83±0,11	0,73±0,19	1,38±0,04*#
T3 Total (ng/mL)	41,96±2,62	48,32±7,44	48,40±6,33
17 -estradiol (pg/mL)	78,88±8,26	74,62±3,50	46,02±4,21*#
Homeostase Glicêmica			
Insulina IUI/mL)	34,71±5,60	42,27±3,69	43,14±22,73
Glicemia (mg/dL)	102,3±5,49	107,8±7,47	100,6±6,89
Perfil lipídico			
Colesterol total (mg/dL)	67,60±5,61	95,25±2,39*	81,00±2,50*#
HDL-c (mg/dL)	31,60±1,07	28,67±0,88	28,80±1,28
LDL-c (mg/dL)	33,87±6,12	62,05±1,77*	43,30±1,77#
Triglicerídeos (mg/dL)	52,00±6,54	37,67±2,33	34,33±2,84*

Valores expressos como média \pm epm de 6 animais por grupo. C: controle caseína; CS: controle soja; S: soja. * vs C; # vs CS ($p < 0,05$)

5.1.4 ESTADO NUTRICIONAL DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM SOJA NA LACTAÇÃO

A Figura 8 mostra a evolução da ingestão de ração e da massa corporal até os 150 dias de idade. A ingestão de ração não diferiu entre as proles do grupo S, C e CS (Figura 8A). Em relação à massa corporal, houve diminuição do 6º ao 21º dia no grupo S em relação ao CS ($p < 0,05$) (Figura 8B). Após o desmame a massa corporal do grupo S se igualou a dos controles (Figura 8C).

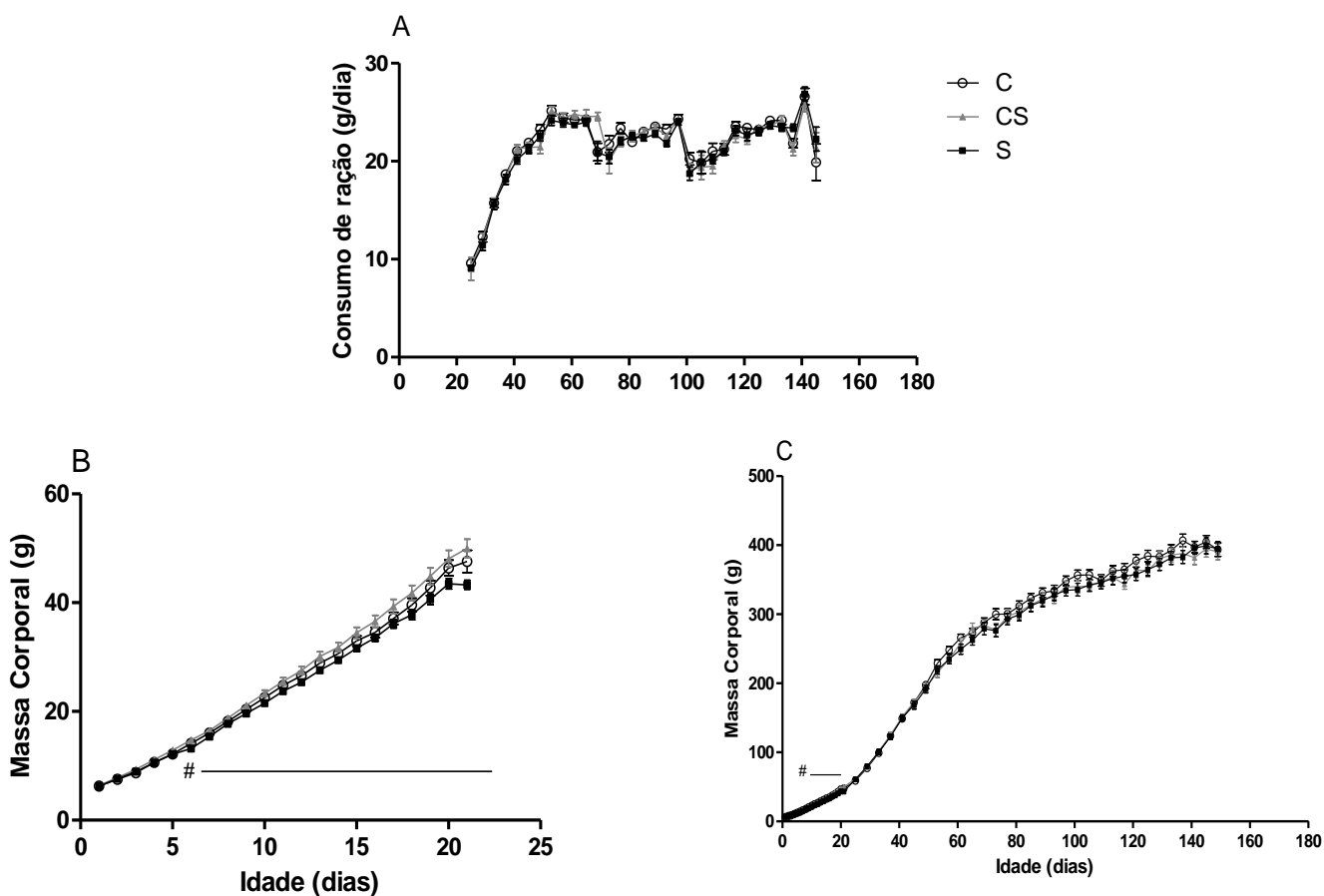


Figura 8: Consumo de ração (A) e massa corporal da prole durante a lactação (B) e até a vida adulta (C), cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs CS.

A adiposidade central das proles não foi alterada em qualquer dos períodos avaliados. Entretanto, aos 21 dias de idade o conteúdo de gordura corporal total foi menor na prole S quando comparado aos grupos CS (-40,9%, $p < 0,0001$) e C (-26,2%, $p < 0,0001$). Aos 150 dias, observou-se aumento do conteúdo mineral total nos animais S em relação ao C e CS (+31,0% e 52,8%, $p < 0,016$, respectivamente). O conteúdo de massa proteica e de água corporal não foram alterados nos períodos avaliados (Tabela 9).

Tabela 9: Adiposidade central e composição corporal das proles dos grupos experimentais aos 21 e 150 dias de idade.

	C	CS	S
21 Dias de Idade			
Adiposidade central (g)	1,09±0,19	1,05±0,05	0,93±0,11
GC (g/100g de carcaça)	16,91±0,49	21,11±0,92*	12,47±0,22*#
MPC (g/100g de carcaça)	17,26±0,59	16,83±0,94	17,13±1,00
CMT (g/100g de carcaça)	3,08±0,17	2,62±0,22	2,78±0,14
CAC (g/100g de carcaça)	64,27±1,60	61,02±2,30	63,41±1,69
150 Dias de Idade			
Adiposidade central (g)	12,28±0,93	14,02±2,23	9,85±0,99
GC (g/100g de carcaça)	26,66±1,78	26,56±1,67	27,48±0,87
MPC (g/100g de carcaça)	29,38±0,50	27,26±1,45	28,76±0,94
CMT (g/100g de carcaça)	4,98±0,35	4,27±0,28	6,53±0,77*#
CAC (g/100g de carcaça)	39,13±1,63	42,34±2,16	40,95±1,59

GC: Gordura corporal total; MCP: Massa proteica corporal; CMT: Conteúdo mineral total; CAC: Conteúdo de água corporal. Valores expressos como média \pm epm de 6 animais por grupo. C: controle caseína; CS: controle soja; S: soja.
* vs C; # vs CS ($p < 0,05$)

Complementado a avaliação do estado nutricional da prole cujas mães receberam soja na lactação, não foi observada alteração nas concentrações séricas de proteína total e albumina em nenhum dos períodos avaliados (Figura 9).

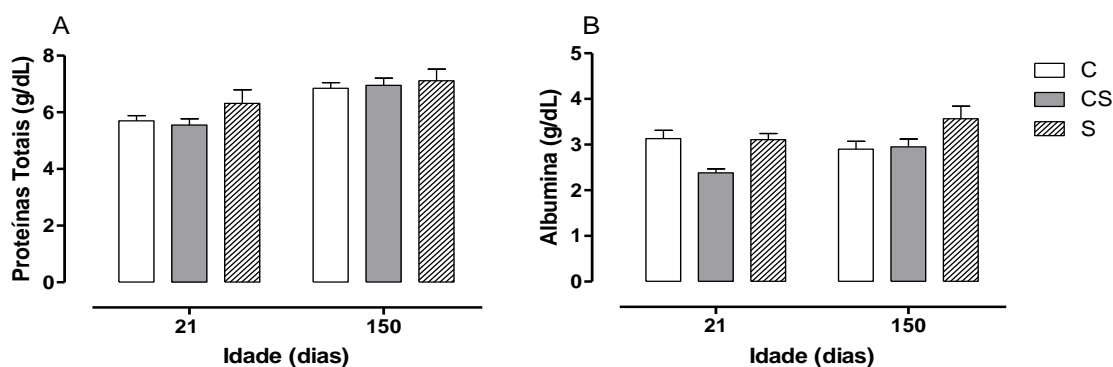


Figura 9: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) da prole aos 21 e 150 dias, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs CS.

5.1.5 PERFIL HORMONAL E METABÓLICO DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM SOJA NA LACTAÇÃO

A figura 10 mostra as concentrações séricas dos hormônios tireoidianos. Aos 21 dias, o T4L sérico foi menor na prole S quando comparado ao grupo C (- 51,9 %, $p < 0,02$); já aos 150 dias, este hormônio foi maior nesses animais (+60,6%, $p < 0,04$). O T3 não foi alterado em nenhum período avaliado.

A prole S apresentou hiperleptinemia aos 21 dias quando comparado aos controles (C: +290%; CS: +129%, $p < 0,02$) (Figura 11). Este hormônio não foi alterado na idade adulta (figura 11).

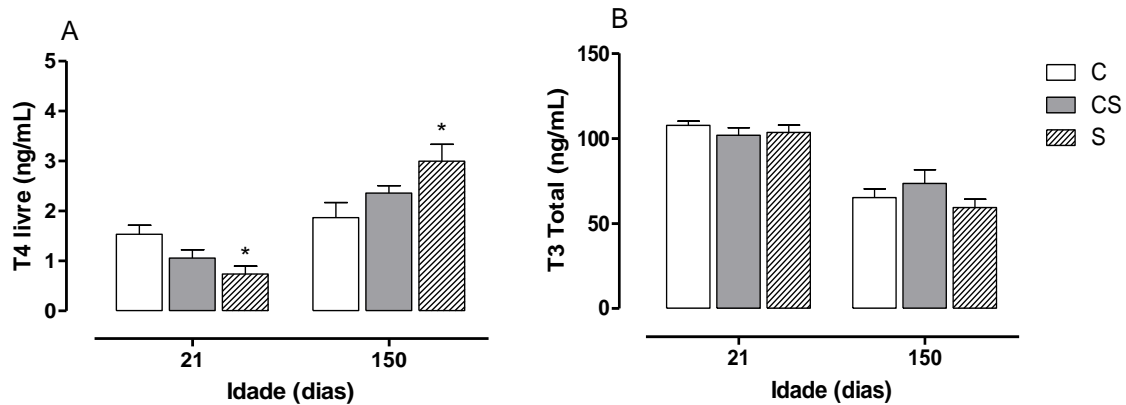


Figura 10: Concentrações séricas de T4 Livre (A) e T3 Total (B) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs CS.

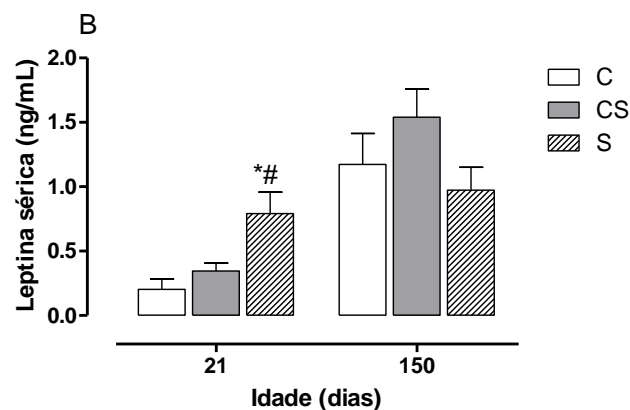


Figura 11: Leptinemia da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs CS.

Homeostase da glicose

A insulinemia e a glicemia não alteraram nas proles aos 21 dias. Na idade adulta, a prole S apresentou insulinemia e glicemia semelhante ao grupo C, porém quando comparada ao CS, observa-se maior insulinemia (+137,54%, $p < 0,0009$), com menor glicemia (-7,34%, $p < 0,02$). Contrariamente, no grupo CS a insulinemia diminuiu (-53,81%, $p < 0,0009$) e a glicemia aumentou (+8,20%, $p < 0,002$) em relação C (figura 12).

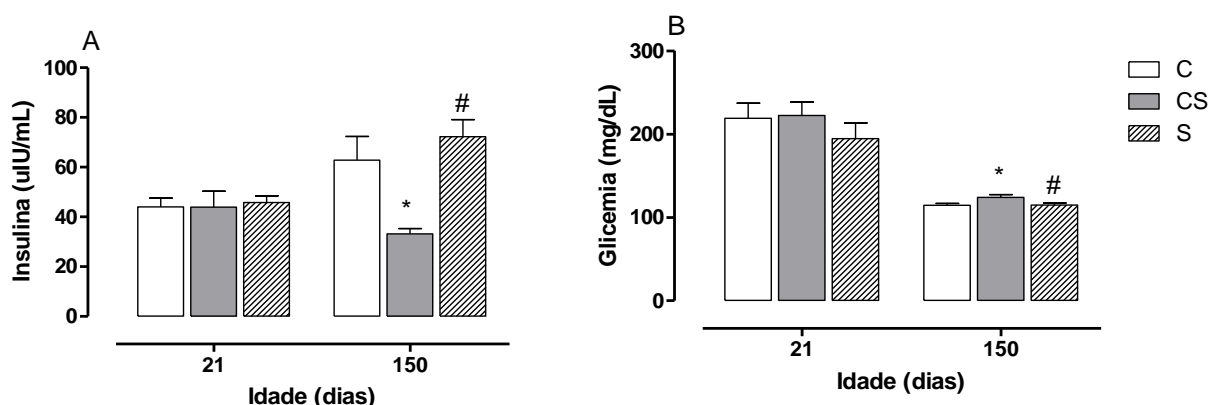


Figura 12: Insulinemia (A), glicemia (B) das proles aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs CS.

Perfil Lipídico

A figura 13 mostra as concentrações séricas de CT (Figura 13A), LDL colesterol (Figura 13B), HDL colesterol (Figura 13C) e TG (Figura 13D) das proles dos grupos experimentais aos 21 e 150 dias de idade. Aos 21 dias, a prole S apresentou diminuição do CT sérico (vs. C: -17% e vs. CH: -34%, $p < 0,0017$) e LDL em relação aos controles (C: -22,2% e vs. CS: -49,3%, $p < 0,0001$), enquanto na prole CS esses parâmetros aumentaram em relação ao grupo C (CT: +19,1%; LDL: +53,5%, $p < 0,0001$). O TG sérico aumentou no grupo S (vs CS:+74,7% e C:+33,5%, $p < 0,007$) respectivamente e diminuiu no

grupo CS em comparação ao grupo C (-23,6, $p < 0,007$). A prole S adulta (150 dias) apresentou diminuição de CT (-19,7, $p < 0,01$) somente em relação ao grupo CS, que por sua vez mostrou aumento de CT em relação ao grupo C (+32,4, $p < 0,01$). O LDL diminuiu na prole S em relação a ambos os controles (CS: -52% e C:33%, $p < 0,0005$; CS: +47,3% e C: +137,4%, $p < 0,0003$) e o TG não foi alterado. O HDL não modificou suas concentrações em nenhum período avaliado.

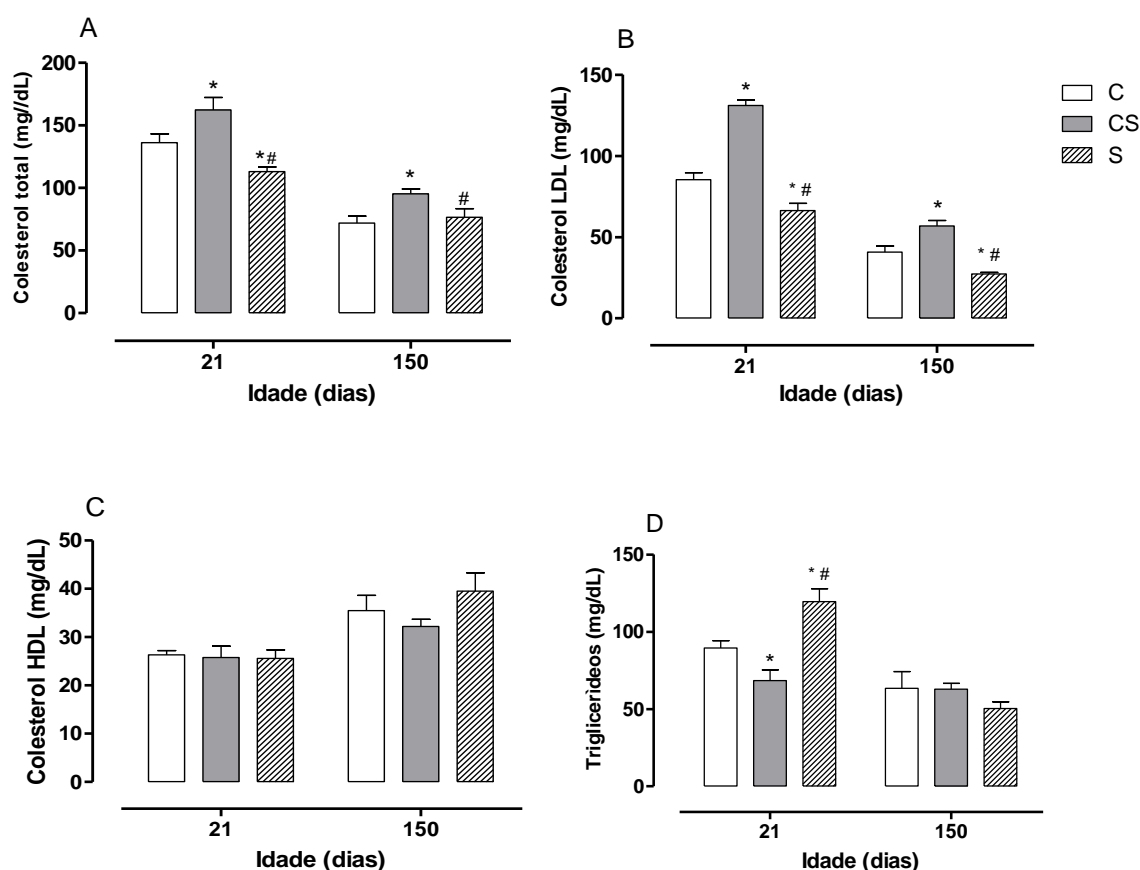


Figura 13 Níveis séricos de Colesterol Total (A), Colesterol LDL (B) Colesterol HDL (C) e Triglicérides (D) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C), controle soja (S) e soja (S) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs CS.

Tabela 10: Resumos do resultados das mães grupo controle, controle soja e soja

	C x CS	S x C	S x CS
Ingestão alimentar	N	↑	↑
Massa corporal	N	N	N
Adiposidade central	N	N	N
Proteínas Totais	N	N	N
Albumina	N	N	N
T4 Livre (ng/mL)	N	↑	↑
T3 Total (ng/mL)	N	N	N
17 -estradiol (pg/mL)	N	↓	↓
Insulina	N	N	N
Glicemia	N	N	N
Colesterol total (mg/dL)	↑	↓	↓
HDL-c (mg/dL)	N	N	N
LDL-c (mg/dL)	↑	N	↓
Triglicerídeos (mg/dL)	N	↓	N

N= Não houve alteração; ↑= ocorreu aumento; ↓= ocorreu diminuição

Tabela 11: Resumo dos resultados da prole ao desmame do grupo controle, controle soja e soja

	C x CS	S x C	S x CS
Ingestão alimentar	N	N	N
Massa corporal	N	N	↓
Proteínas Totais	N	N	N
Albumina	N	N	N
Adiposidade central	N	N	N
Gordura Corporal Total	N	↓	↓
Massa Proteica Corporal	N	N	N
Conteúdo Mineral Total	N	↑	↑
T4 Livre	N	↓	N
T3 Total	N	N	N
Leptina	N	↑	↑
Insulina	N	N	N
Glicemia	N	N	N
Colesterol total	↑	↓	↓
HDL-c	N	N	N
LDL-c	↑	↓	↓
Triglicerídeos	↓	↑	↑

N= Não houve alteração; ↑ = ocorreu aumento; ↓ = ocorreu diminuição

Tabela 12: Resumo dos resultados da prole adulta dos grupos controle, controle soja e soja

	C x CS	S x C	S x CS
Ingestão alimentar	N	N	N
Massa corporal	N	N	N
Proteínas Totais	N	N	N
Albumina	N	N	N
Adiposidade central	N	N	N
Gordura Corporal	N	N	N
Massa Proteica Corporal	N	N	N
Conteúdo Mineral Total	N	↑	↑
CAC	N	N	N
T4 Livre	N	↑	N
T3 Total	N	N	N
Leptina	N	N	N
Insulina	↓	N	↑
Glicemia	↑	N	↓
Colesterol total	↑	N	↓
HDL-c	N	N	N
LDL-c	↑	↓	↓
Triglicerídeos	N	N	N

N= Não houve alteração; ↑ = ocorreu aumento; ↓ = ocorreu diminuição

5.2 MODELO EXPERIMENTAL 2 – EFEITOS DA PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

5.2.1 ESTADO NUTRICIONAL DAS RATAS LACTANTES

Ratas lactantes que consumiram PIS durante a lactação apresentaram alterações esporádicas na ingestão alimentar (Dias 14, 18, 19 e 20), mas não modificaram a sua massa corporal e a adiposidade central, em relação ao controle (Figura 14). Em relação às concentrações séricas de proteína total e albumina não observamos alteração entre os grupos (Figuras 15A e 15B).

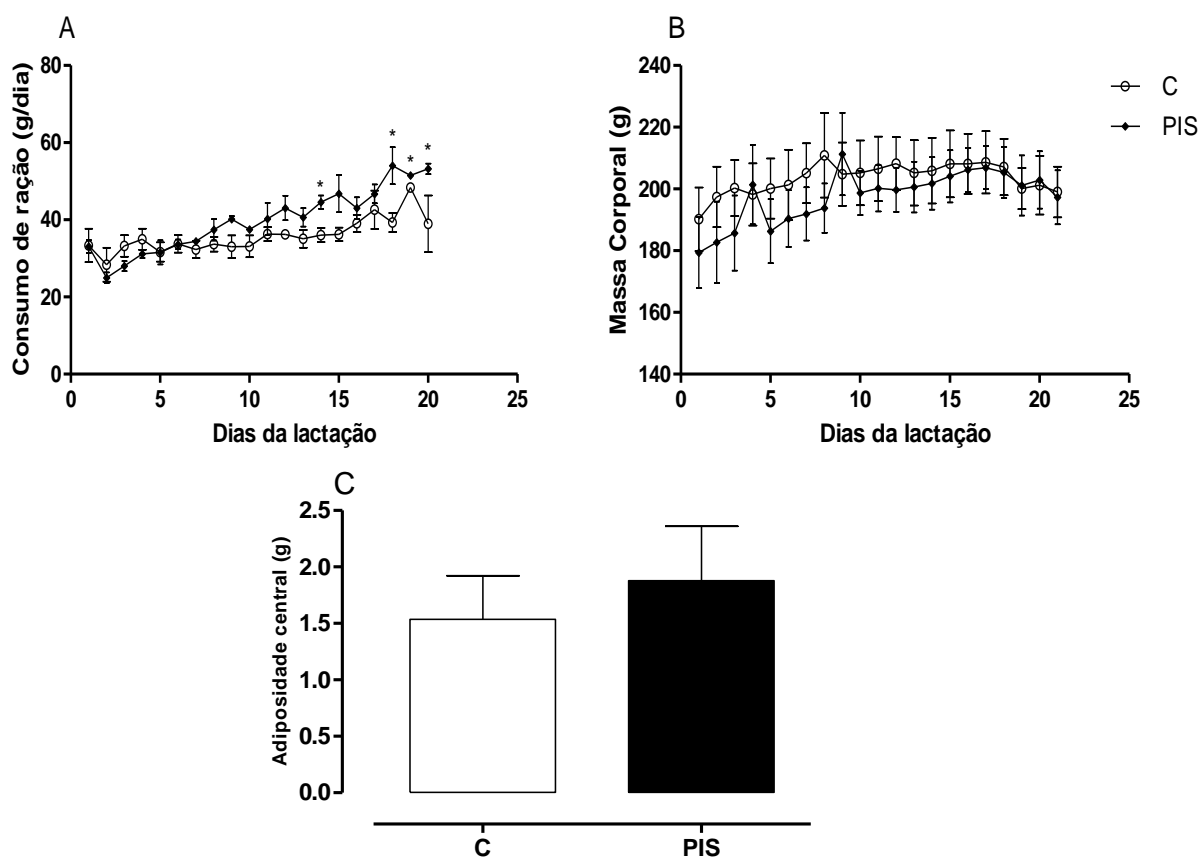


Figura 14: Consumo diário de ração (A), massa corporal (B) e adiposidade central (C) das ratas que receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

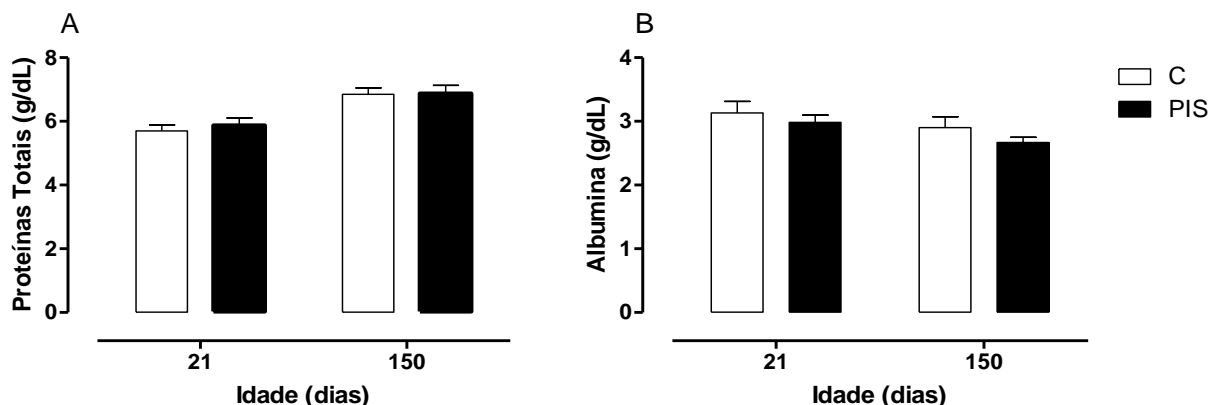


Figura 15: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) das ratas que receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

5.2.2 CONTEÚDO DE PROTEÍNA, COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEO E LEPTINA DO LEITE DAS RATAS LACTANTES

O leite das mães que ingeriram PIS durante a lactação não apresentou alteração nas concentrações de proteína, CT, TG e leptina (tabela 13).

Tabela 13: Conteúdo de proteína, colesterol total, triglicerídeos e leptina do leite das ratas que consumiram proteína isolada de soja durante a lactação

	C	PIS
Proteína (g/dL)	10,56 \pm 1,72	9,88 \pm 1,32
Colesterol Total (mg/dL)	734,30 \pm 22,27	702,90 \pm 34,94
Triglicerídeos (mg/dL)	554,90 \pm 71,17	599,30 \pm 65,56
Leptina (ng/mL)	1,48 \pm 0,07	1,47 \pm 0,07

Valores expressos como média \pm epm de 6 animais por grupo. C: controle caseína; PIS: proteína isolada de soja. * vs C, ($p < 0,05$).

5.2.3 PERFIL HORMONAL E METABÓLICO AO DESMAME DAS RATAS LACTANTES

As ratas que consumiram PIS durante a lactação apresentaram aumento do T4L (+ 42,6%, $p < 0,04$), sem alterar os níveis séricos os níveis séricos de T3T total, e estradiol (tabela 14).

As concentrações séricas de insulina e glicemia, assim como o IRI não alteraram nas mães que consumiram PIS na lactação. Também não foram observadas alterações nas concentrações séricas de CT, LDL, HDL e TG (tabela 14).

Tabela 14: Perfil hormonal e metabólico das ratas PIS ao desmame

	C	PIS
Perfil hormonal		
T4 Livre (ng/mL)	0,83±0,11	1,18±0,07*
T3 Total (ng/mL)	41,96±2,62	40,01±2,65
17 -estradiol (pg/mL)	78,88±8,26	62,84±7,56
Homeostase Glicêmica		
Insulina IUI/mL)	34,71±5,60	31,41±3,71
Glicemia (mg/dL)	102,3±5,49	103,5±8,31
Perfil lipídico		
Colesterol total (mg/dL)	67,60±5,61	66,60±4,12
HDL-c (mg/dL)	31,60±1,07	30,80±1,88
LDL-c (mg/dL)	33,87±6,12	30,25±6,12
Triglicerídeos (mg/dL)	52,00±6,54	43,75±6,210

Valores expressos como média ± epm de 6 animais por grupo. C: controle caseína; PIS: Proteína isolada de soja. * vs. C, $p < 0,05$.

5.2.4 ESTADO NUTRICIONAL DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM PIS NA LACTAÇÃO

O consumo de ração não diferiu entre as proles dos grupos PIS e C. Em relação à massa corporal, houve diminuição (- 6,58%, $p < 0,03$) pontual no dia 11 na prole PIS, nos demais dias não ocorreu nenhuma alteração entre os grupos (figura 16).

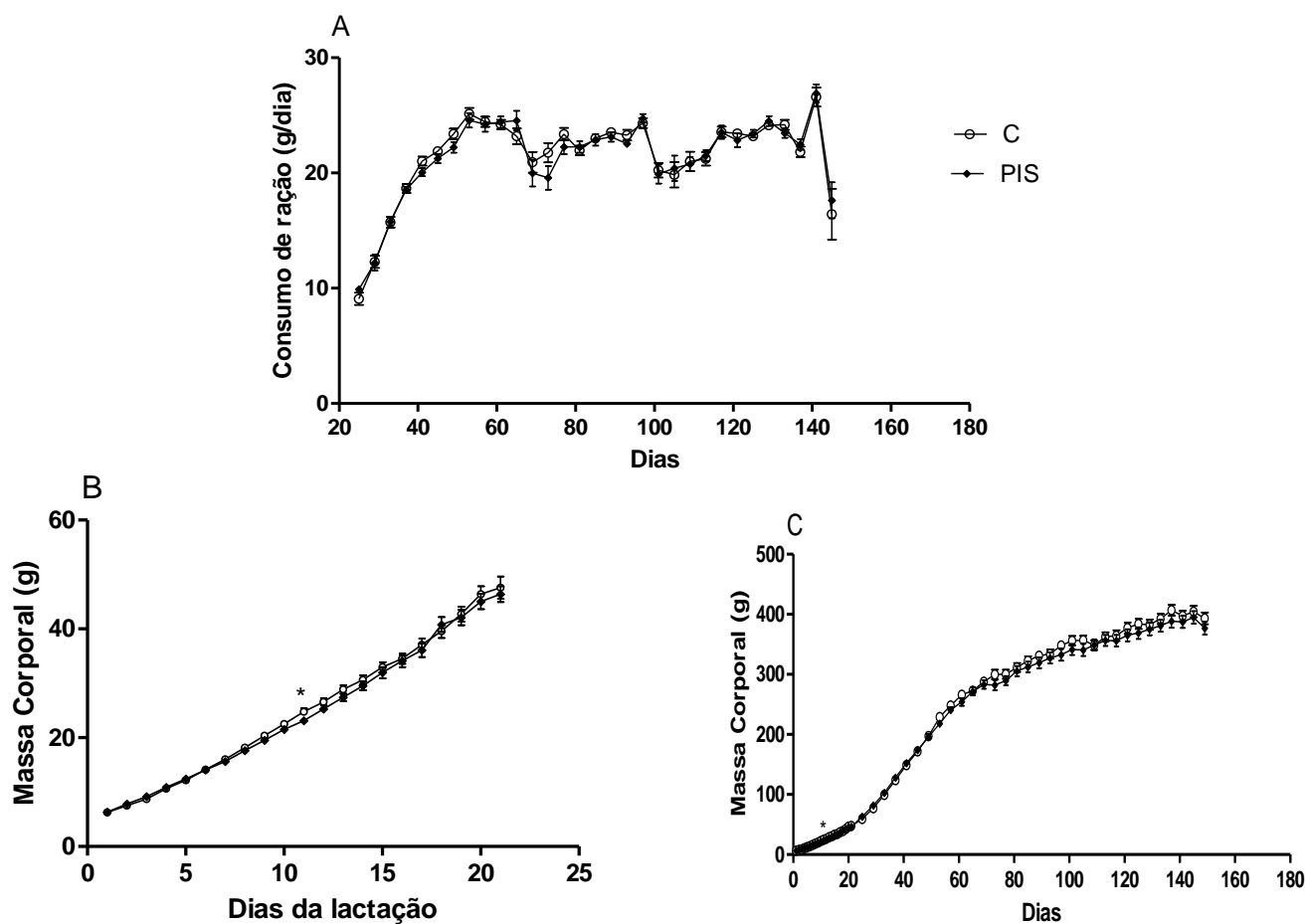


Figura 16: Consumo de ração (A) e massa corporal da prole até o desmame (B) e na vida adulta (C), cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

No que diz respeito à composição química da carcaça, não houve diferença nos conteúdos de umidade, gordura, proteína e cinzas aos 21 dias de idade. Já aos 150 dias, houve aumento na umidade (+12,70; $p < 0,01$), diminuição do conteúdo de proteína (-10,10; $p < 0,01$) e cinzas (-18,91; $p < 0,007$) no grupo PIS em relação ao C. A adiposidade central não foi alterada nos períodos avaliados (Tabela 15).

Tabela 15: Adiposidade central e composição corporal das proles PIS aos 21 e 150 dias de idade.

	C	PIS
21 Dias de Idade		
Adiposidade central (g)	1,09±0,19	1,32±0,2355
GC (g/100g de carcaça)	16,91±0,49	17,01±1,278
MPC (g/100g de carcaça)	17,26±0,59	17,29±0,59
CMT (g/100g de carcaça)	3,08±0,17	3,13±0,13
CAC (g/100g de carcaça)	64,27±1,60	62,39±0,88
150 Dias de Idade		
Adiposidade central (g)	12,28±0,93	10,38±0,80
GC (g/100g de carcaça)	26,66±1,78	27,51±0,56
MPC (g/100g de carcaça)	29,38±0,50	26,41±0,83*
CMT (g/100g de carcaça)	4,98±0,35	3,79±0,20*
CAC (g/100g de carcaça)	39,13±1,63	44,10±0,43*

GC: Gordura corporal total; MCP: Massa proteica corporal; CMT: Conteúdo mineral total; CAC: Conteúdo de água corporal. Valores expressos como média \pm epm de 6 animais por grupo. C: controle caseína; PIS: Proteína isolada de soja. * vs. C, $p < 0,05$.

O consumo materno de PIS na lactação não alterou as concentrações séricas de proteína total e albumina na prole em nenhum dos períodos avaliados (Figura 17).

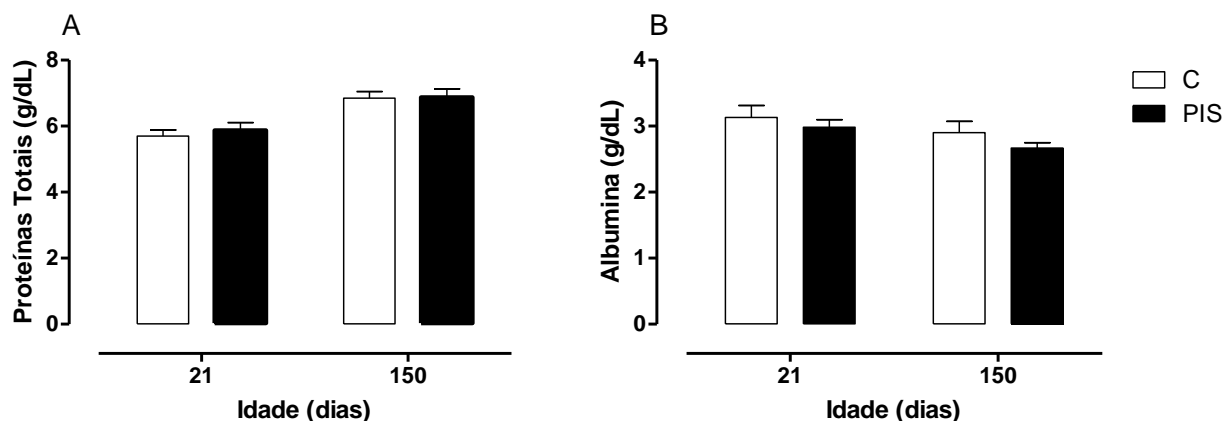


Figura 17: Concentrações séricas de proteínas totais (A) e albumina (B) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

5.2.5 PERFIL HORMONAL E METABÓLICO DAS PROLES CUJAS MÃES CONSUMIRAM PIS NA LACTAÇÃO

A prole PIS, não modificou as concentrações séricas de T3 total, mas apresentou diminuição do T4 livre (-32,53; $p < 0,03$) aos 21 dias e aumento (+47,5; $p < 0,04$) aos 150 dias (figura 18).

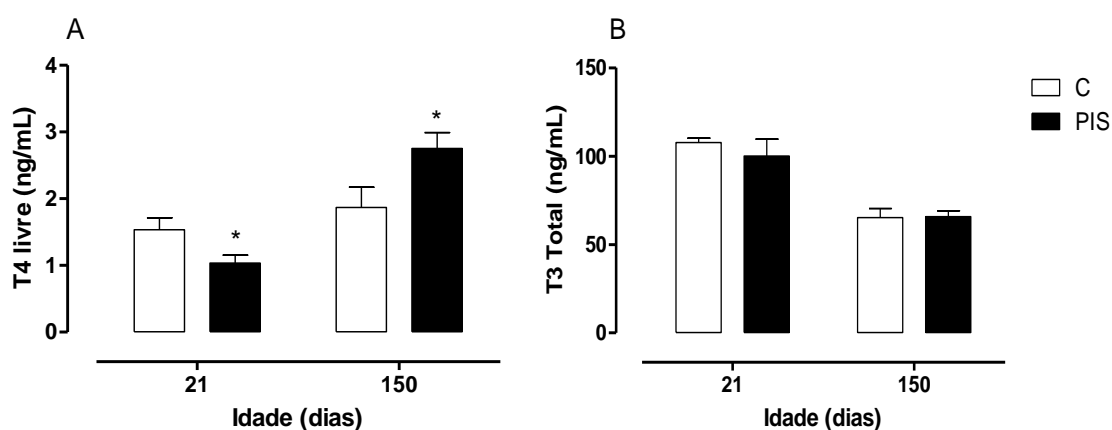


Figura 18: Concentrações séricas de T4 livre (A) e T3 total (B) da prole aos 21 e 150 dias, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

A leptinemia não foi alterada nem aos 21 dias e nem aos 150 dias de idade (figura 19).

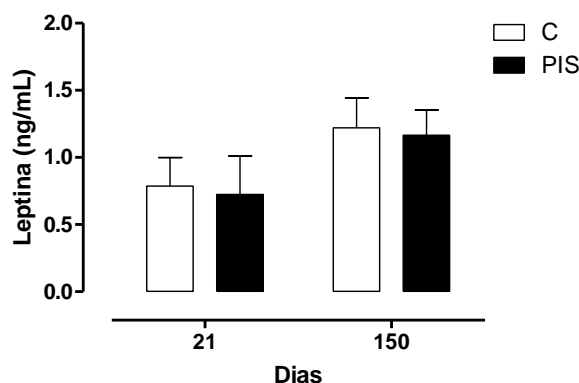


Figura 19: Leptinemia da prole aos 21 e 150 dias (B), cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

Homeostase da glicose

Concentrações séricas de insulina e glicemia não mudaram nas proles aos 21 dias, mas aos 150 dias, a prole PIS apresentou hiperinsulinemia em relação ao grupo C (+ 19,20%, $p < 0,04$) sem alterar a glicemia (figura 20).

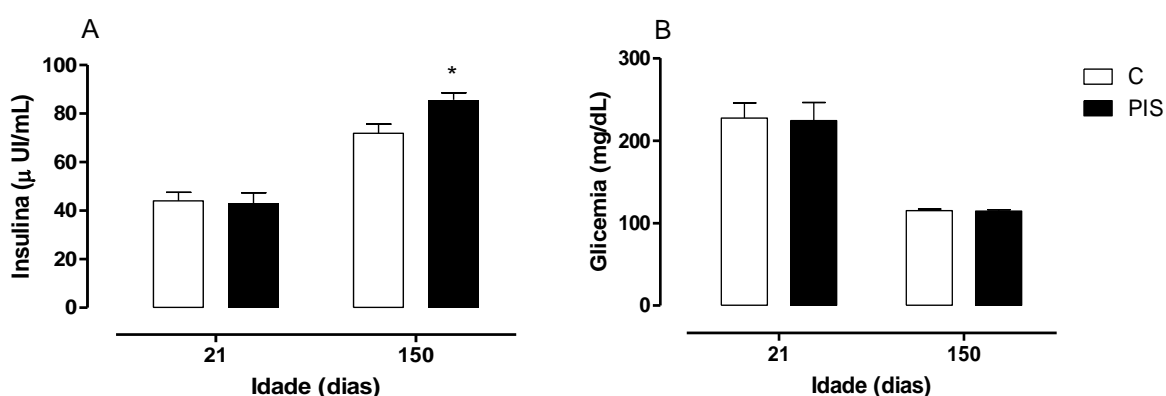


Figura 20: Níveis séricos de insulina (A), glicose (B) das proles aos 21 e 150 dias, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS) durante a lactação. Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

Perfil lipídico

A prole cuja mãe consumiu PIS na lactação apresentou redução (-32,82%, $p < 0,0001$) do CT ao desmame e aumento (+21,94%, $p < 0,04$) na vida adulta. O LDL foi menor (-39,61%, $p < 0,001$) apenas aos 21 dias e o TG maior (55,39%, $p < 0,03$) aos 150 dias. O HDL não sofreu alteração entre os grupos nos períodos avaliados (figura 21).

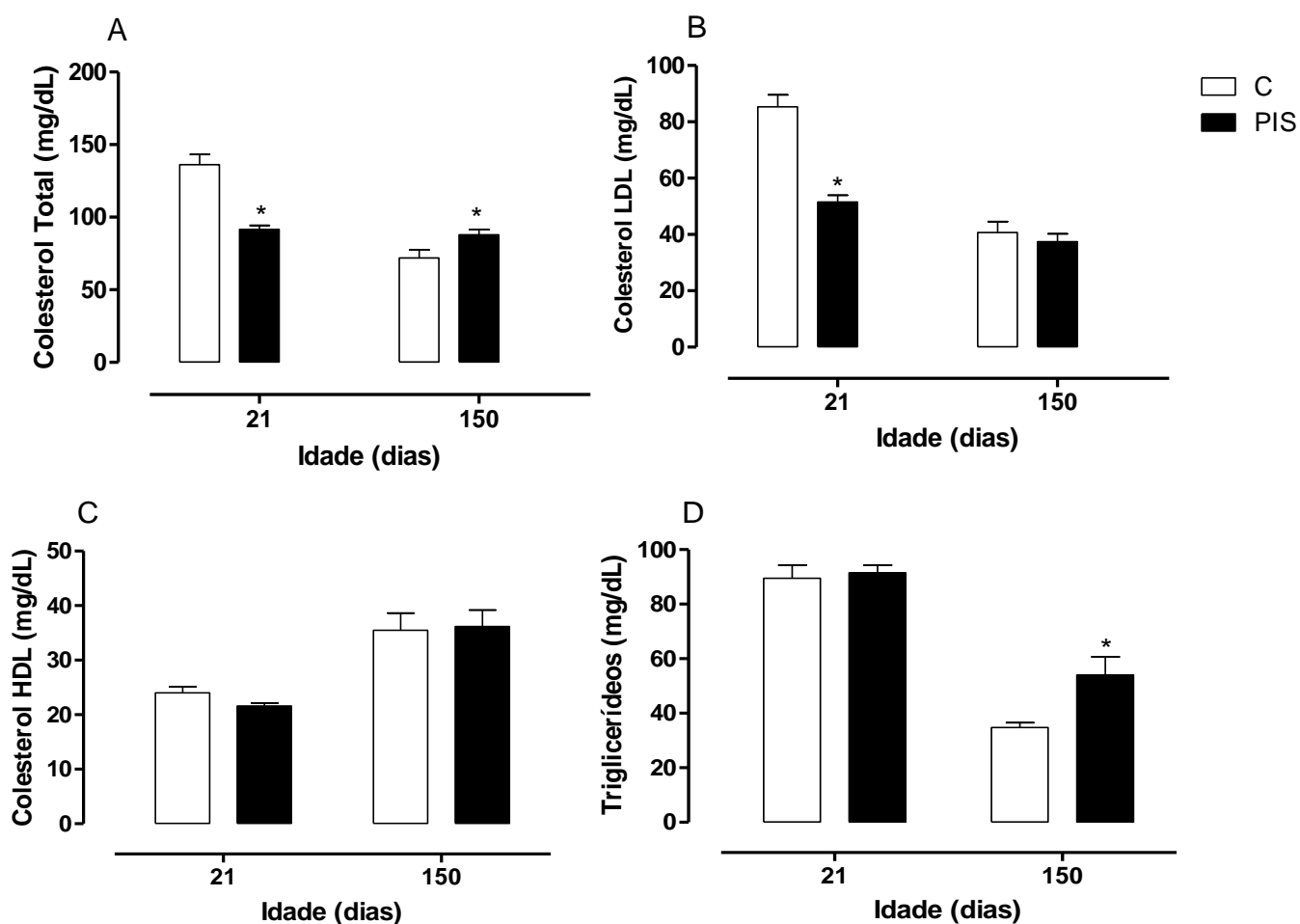


Figura 21: Concentrações séricas de Colesterol Total (A), Colesterol LDL (B) Colesterol HDL (C) e Triglicerídeos (D) da prole aos 21 e 150 dias de idade, cujas mães receberam dieta controle (C) e proteína isolada de soja (PIS). Os dados experimentais foram obtidos utilizando-se 6 animais de cada grupo. Dados expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ vs C.

Tabela 16: Resumo dos resultados maternos e da prole aos 21 e 150 dias do grupo proteína isolada de soja

	MÃE	PROLE 21D	PROLE 150D
	PIS x C	PIS x C	PIS x C
Ingestão alimentar	↑	N	N
Massa corporal	N	N	N
Proteínas Totais	N	N	N
Albumina	N	N	N
Adiposidade central	N	N	N
Gordura Corporal Total	-	N	N
Massa Proteica Corporal	-	N	↓
Conteúdo Mineral Total	-	N	↓
T4 Livre	↑	↓	↑
T3 Total	N	N	N
17 -estradiol	N	-	-
Leptina	-	N	N
Insulina	N	N	↑
Glicemia	N	N	N
Colesterol total	N	↓	↑
HDL-c	N	N	N
LDL-c	N	↓	N
Triglicerídeos	N	N	↑

N= Não houve alteração; ↑= ocorreu aumento; ↓= ocorreu diminuição

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo corroboram com dados epidemiológicos e experimentais, que dão suporte à hipótese de que alterações nutricionais ou hormonais em períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação e/ou a lactação, podem resultar em modificações estruturais, metabólicas e funcionais de tecidos e sistemas do organismo, que podem se tornar permanentes na idade adulta, resultando no desenvolvimento de doenças (MOURA & PASSOS, 2005, PASSOS, 2007; BONOMO *et al.*, 2007; LISBOA *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2008, FIGUEIREDO *et al.*, 2009; TROINA *et al.*, 2010).

Usando dois modelos experimentais conduzidos simultaneamente, foram demonstrados os efeitos do consumo materno de soja ou de sua proteína isolada, durante a lactação, na programação do estado nutricional e endócrino-metabólico da progênie adulta. O que torna este estudo particular, em relação aos outros desenvolvidos até agora, é o fato de termos trabalhado com o alimento soja, enquanto a maioria dos outros avaliaram os efeitos das isoflavonas isoladas. Além disso, o período de exposição neste trabalho foi exclusivamente a lactação, enquanto os trabalhos encontrados avaliaram a exposição às isoflavonas ou PIS no período intrauterino ou na gestação ou gestação e lactação simultaneamente.

No presente estudo, foi possível notar que algumas alterações são divergentes quando há o consumo de soja ou de sua proteína isolada, e parecem ser mais pronunciadas com a ingestão de soja, principalmente em relação às alterações metabólicas. De fato tem sido relatado na literatura que os efeitos do consumo do alimento é capaz de trazer benefícios ao organismo que não são replicados quando há ingestão do nutriente ou componente bioativo isolado (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

Uma possível explicação para as diferenças encontradas entre o tratamento com soja e PIS, é a maior quantidade de isoflavonas na dieta ofertada para as mães S. Não foi possível determinar o teor de isoflavonas nas dietas utilizadas, mas foi feita uma estimativa baseada na quantidade de isoflavonas na farinha de soja e na PIS relatada na literatura (BARBOSA *et al.*, 2006), sugerindo que a dieta do grupo S apresenta 108 mg de isoflavonas e a

do grupo PIS 24,8 mg. Observamos que a ingestão média de ração ao longo da lactação no grupo S foi de 30,4 g e no grupo PIS 40,9 g. Desta forma, a ingestão diária estimada de isoflavonas foi de 32,8 mg nas ratas S e 10,14 mg nas ratas PIS.

As isoflavonas, presentes em altas concentrações na soja, são uma classe de fitoestrogênio, que tem a capacidade de interagir de forma agonista ou antagonista com os receptores de estrogênio α (ER α) e β (ER β) no organismo, e mimetizar as ações do estrogênio em tecidos alvos (PERON *et al.*, 2008). Em função desta ação, estudos relacionam as isoflavonas como um dos principais componentes da soja, capaz de gerar modificações metabólicas, semelhante ao estrogênio (CEDERROTH *et al.*, 2007; CEDERROTH & NEF, 2009). Nota-se que a exposição a este composto possa ocorrer já na lactação, uma vez que, há relatos da passagem de isoflavonas no leite materno (FRANK & CUSTER, 1996; FRITZ *et al.*, 1998). Desta forma, é provável que a maior oferta de isoflavonas nas ratas S na lactação, promova maior transferência desta pelo leite, e seja um fator que contribua para que as alterações sejam mais pronunciadas nestas e nas suas proles.

Surpreendentemente, evidenciamos menor concentração de estradiol sérico somente nas mães S. Os fatores envolvidos nesta diminuição não são conhecidos, mas acreditamos que além do efeito da maior oferta de isoflavonas na dieta S, que pode estar exercendo o efeito do estradiol no organismo e assim poupando-o de produzi-lo; a maior transferência de estradiol da mãe para o filhote através do leite, pode ser um fator plausível, uma vez que e em outros modelos de programação esta transferência já foi relatada (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; TROINA *et al.*, 2010).

A ingestão de S e de PIS durante a lactação, causou alterações pontuais no consumo alimentar das mães. A redução dos níveis séricos de 17 β -estradiol no grupo S, pode ter contribuído para o aumento da ingestão alimentar em alguns dias, uma vez que, o estradiol atua nos receptores de estrogênio presentes no hipotálamo, reduzindo a alimentação através de vias que envolvem redução da liberação ou expressão de neuropeptídeo Y (NPY) e da grelina (BROWN & CLEGG, 2010). Essa relação não pode ser extrapolada para as mães PIS, já que nestas não há alteração do estradiol sérico.

Apesar das alterações pontuais na ingestão alimentar, nos grupo S e

PIS, não foram observadas modificações na massa corporal e na adiposidade central materna. Não encontramos relatos na literatura sobre efeitos do consumo de S ou de PIS somente no período da lactação sobre estes parâmetros. Jahan-mihan *et al* (2011a), avaliaram o efeito do consumo de PIS durante a gestação e gestação/lactação, demonstrando que não ocorreu alteração ponderal durante a gestação, mas houve redução da massa corporal no pós-parto e primeira semana de lactação, quando comparada ao grupo caseína. Dessa forma, a não alteração desse parâmetro no nosso estudo, pode ser em decorrência do período em que a dieta foi ofertada (lactação).

Não foi evidenciada alteração nas concentrações séricas de proteína total e albumina nas mães que consumiram soja ou PIS na lactação, o que indica que apesar de terem consumido proteína vegetal, estas não sofreram desnutrição proteica, o que comprometeria a avaliação da programação da prole, uma vez que a desnutrição materna em si programa parâmetros que foram avaliados no estudo (PASSOS *et al.*, 2000; PASSOS *et al.*, 2001; PASSOS *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2002).

A prole PIS não apresentou alteração na ingestão alimentar, na sua massa corporal e adiposidade central ao desmame e na vida adulta. Contudo, a prole cujas mães consumiram soja na lactação, apresentou redução da massa corporal do 6º ao 21º dia de idade, somente em relação a prole CS, e menor gordura corporal em relação a ambos os controles, sem alterar a adiposidade central. Como mencionado anteriormente, sugerimos que há uma maior transferência de estradiol para a prole através do leite, o que aumentaria a exposição desses animais para esse hormônio, o que pode ter contribuído para a redução da massa corporal e da gordura corporal total ao desmame, já que o estradiol diminui a adipogênese e o acúmulo de gordura corporal (BROWN & CLEGG, 2010).

Em adição, pesquisas evidenciam que as isoflavonas são capazes de regular a expressão de diversos genes envolvidos no anabolismo e catabolismo de lipídeos em diversos tecidos de depósito (tecido adiposo, fígado e músculo esquelético), causando aumento da oxidação dos ácidos graxos e diminuição dos lipídeos (PARK *et al.*, 2009; YANG, 2012; PALACIOS-GONZÁLEZ, 2014). Nos adipócitos, esses fitoestrogênios da soja podem

interagir com receptores ER α , diminuindo a atividade da enzima lipase lipoproteica, responsável pela captação de lipídeos pelas células adiposas, levando assim ao menor acúmulo de gordura (TORREZAN *et al.*, 2008).

As alterações na massa e adiposidade corporal ao desmame observada na prole S não repercutiram sobre o estado nutricional destes animais na idade adulta, uma vez que não evidenciamos alterações nestes parâmetros aos 150 dias de idade.

Outro achado interessante foi que a ingestão materna de PIS levou a redução do conteúdo mineral total (dosagem de cinzas), enquanto que a ingestão de S programou para o aumento do conteúdo mineral total em relação a ambos os controles. A determinação do conteúdo mineral total, apesar de não ser o método mais adequado para estimar a densidade mineral óssea, por quantificar todos os minerais presentes, pode auxiliar na inferência desta.

Uma possível justificativa para as diferenças encontradas seria uma maior transferência de isoflavonas para a prole S no período da lactação, pois pesquisas demonstram relação positiva do consumo de soja, da sua proteína e principalmente das isoflavonas sobre a densidade mineral óssea (SIMÃO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2012, BAGLIA *et al.*, 2015), através de mecanismos que envolvem o aumento da síntese e proliferação de osteoblastos e inibição de osteoclastos, promovendo assim maior deposição de cálcio e fósforo no tecido ósseo (YANG *et al.*, 2012). Contudo esses resultados são ainda controversos, e dependendo da fonte ofertada a resposta pode ser distinta (IKEDA, 2006).

O consumo materno de PIS programou para redução do conteúdo de proteína da carcaça, mas não alterou proteína total e albumina séricas. Não foram encontrados estudos que associassem o consumo de PIS a diminuição da massa magra. Entretanto Jahan-mihan *et al* (2011a) confirmaram a hipótese que dietas nutricionalmente equilibradas, mas com fontes proteicas diferentes, durante a gestação, ou gestação/lactação, exercem efeitos distintos no organismo, sendo postulado por eles que essas alterações são decorrentes da diferença do perfil de aminoácidos presentes na caseína e na proteína da soja, sendo essa uma possível justificativa para a redução de proteína corporal.

Não foram observadas alterações nas concentrações séricas de insulina e glicemia nas mães que receberam S ou PIS. Contudo a dieta materna levou a mudanças hormonais e na glicemia na progênie. A prole S apresentou hiperleptinemia ao desmame, apesar da menor adiposidade corporal. O aumento sérico da leptina pode ser devido a maior passagem de estrogênio pelo leite nesse grupo, já que o estrogênio estimula a síntese de leptina (CLEGG *et al.*, 2006; BROWN & CLEGG, 2010). Outra possível justificativa, seria um menor *clearance* de leptina nesta idade. O *feedback* negativo da leptina sobre a produção e secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas já está bem estabelecido (BENATTI & JUNIOR, 2007). No entanto, este *feedback* negativo parece estar comprometido na prole S, pois observamos hiperleptinemia ao desmame, sem alteração da insulinemia e glicemia nesta idade.

Foi possível notar que a prole cujas mães consumiram soja na lactação manteve os níveis de insulinemia e glicemia semelhantes ao grupo C, e que o consumo da dieta CS, que possui teor de lipídeo semelhante a dieta S, levou a redução da insulinemia e aumento da glicemia. Dessa forma, os animais CS parecem apresentar síntese ou secreção comprometida de insulina.

Na idade adulta, a prole PIS apresentou hiperinsulinemia sem alterar a glicemia. Esses dados indicam que esses animais foram programados para resistência subclínica à insulina, uma vez que a manutenção da glicemia foi devido a maior secreção de insulina.

A insulina estimula a lipogênese e inibe a lipólise, além de influenciar na síntese e secreção de leptina (BENATTI & JUNIOR, 2007). Já foi evidenciado que a hiperinsulinemia sustentada aumenta as concentrações séricas de leptina em humanos e ratos (KOLACZYNSKI *et al.*, 1996; CUSIN *et al.*, 1996; BRYSON *et al.*, 1999; AHIMA & FLIER, 2000; WALKER *et al.*, 2005). Por outro lado, no presente estudo, a prole adulta cujas mães consumiram PIS na lactação apresentou hiperinsulinemia, sem alterar a lipogênese e a leptinemia, o que indica que, a prole PIS foi programada para resistência seletiva a ação da insulina no tecido adiposo.

Jahan-mihan *et al* (2011a, 2001b), também demonstraram um aumento da insulinemia na prole adulta masculina, cujas mães receberam PIS na

gestação e lactação. Esses autores sugerem que essa alteração pode ser decorrente da qualidade proteica oferecida nas dietas, uma vez que, o perfil de aminoácidos, a presença de peptídeos bioativos e a cinética de digestão são diferentes em relação a caseína. Adicionalmente, a proteína de soja possui duas vezes mais arginina que a caseína, sendo esse aminoácido considerado um potente insulínico, aumentando a secreção de insulina (JAHAN-MIHAN *et al.*, 2011a, JAHAN-MIHAN *et al.*, 2011b).

A ingestão de S e PIS foi ainda capaz de causar alterações nas concentrações séricas de hormônios tireoidianos nas mães, com aumento de T4 livre em relação aos grupos controles, sem alterar os níveis de T3 total. Um dos fatores que pode ter contribuído para o aumento da fração de T4 livre verificado nas mães S é a redução do 17β – estradiol sérico, uma vez que este estimula a síntese das proteínas transportadoras dos hormônios tireoidianos. Dessa forma, a menor concentração sérica de 17β – estradiol pode contribuir para redução da síntese destes transportadores, e conseqüentemente, aumentar a concentração sérica da fração livre de tiroxina (DOUGLAS, 2006). Além disso, o hipoestrogenismo evidenciado nas ratas S diminui a taxa de metabolização do T4, o que pode colaborar para o seu aumento (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Apesar das evidências do efeito bociogênico da soja e seus componentes sobre a função da tireoide (FORT *et al.*, 1990; CHORAZY *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 2000), não foi encontrado estudos que tenham avaliado o efeito do consumo materno do alimento soja no período da lactação sobre os hormônios tireoidianos da prole. Porém, há evidências que a exposição a alimentos que contem fitoestrogênio em fase crítica do desenvolvimento, como a lactação, pode programar alterações na função da tireoide na prole adulta, como demonstrado em ratas lactantes com o consumo de linhaça, que possui o fitoestrógeno lignana, que exerce efeitos semelhantes às isoflavonas da soja (LUCAS *et al.*, 2002). Figueiredo *et al.* (2011) mostrou que o consumo materno de dieta suplementada com linhaça na lactação, gera na prole, ao desmame, hipotireoidismo, com T3 sérico baixo e TSH alto, e programa disfunção na tireoide da prole adulta, com menor T4 livre.

No presente estudo, o consumo materno de S ou PIS na lactação também alterou a função tireoidiana da prole, porém de forma diferente ao observado para a linhaça. Observamos que ao desmame, a prole S e PIS apresentaram menor T4 livre, e na idade adulta maior concentração deste hormônio.

O aumento de T4 livre nas mães ao final da lactação pode ser um dos fatores implicados na disfunção tireoidiana observada nas proles. Além disso, as mães do grupo S apresentaram redução do estradiol, o que nos faz inferir novamente que ocorreu uma maior passagem desse hormônio através do leite, já que apenas a descendência S apresentou redução do T4 livre aos 21 dias. Nesta prole provavelmente a concentração de proteínas transportadoras de tiroxina, assim como a metabolização de T4 estão aumentados, induzido pelo maior concentração de estrogênio advindo do leite.

A leptina vem sendo relacionada como capaz de atuar sobre a tireoide, uma vez que, já foi evidenciada presença de receptores do tipo ObR nesta glândula (NOWAK *et al*, 2002). Diferentemente dos nossos achados, CRAVO (2002) demonstrou em animais que apresentaram hiperleptinemia ao desmame, aumento significativo da captação de iodo, e das concentrações dos hormônios tireoidianos, sem alterar o TSH. Aos 120 dias, não houve alteração na captação de iodo, mas houve redução dos hormônios tireoidianos e aumento do TSH séricos, sendo sugerido uma possível resistência a ação da leptina (CRAVO, 2002).

Outro achado, é que animais tratados com leptina durante os primeiros 10 dias de vida foram programados para aumento de T3 e T4 total séricos, sem alterar a captação de iodo pela tireoide e a concentração de TSH (TEXEIRA *et al*, 2003). Assim, apesar de algumas divergências, os estudos convergem para o aumento dos hormônios tireoidianos pela ação da leptina, o que não aconteceu em nosso trabalho, pois ocorreu hiperleptinemia na prole S ao desmame, com redução de T4 livre, reafirmando novamente uma possível resistência a ação deste hormônio no organismo. Entretanto, a prole PIS tem menor T4 sérico, mas não alterou a leptinemia.

Também não podemos descartar a ação das isoflavonas da soja na função tireoidiana da progênie, pois há relatos da transferência de isoflavonas da soja no leite materno (FRANK & CUSTER, 1996; FRITZ *et al.*, 1998), e efeito negativo destas na função tireoidiana. Tem sido observada interferência na utilização de iodo e inibição da atividade da peroxidase tireóidea (TPO) (IKEDA *et al.*, 2000; DOERGE & CHANG, 2002). Entretanto, é sugerido que essas alterações parecem ter importância clínica somente quando associadas à deficiência de iodo (KAJIYA *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 2000). Em relação aos níveis séricos dos hormônios tireóideos, alguns estudos mostram aumento (FORSYTHE, 1995; KAVANAGH *et al.*, 2008) outros diminuição (KAJIYA *et al.*, 2005) ou nenhuma alteração (CHANG & DOERGE, 2000).

Diferente dos nossos achados, Loutchanwoot *et al.* (2015) demonstraram que a exposição ao equol está relacionada com menor regulação de mRNA de TRH hipotalâmico e TSH na hipófise, redução dos níveis T4 e T3 totais sem alterar suas frações livres e o TSH. Os autores sugerem que os fitoestrogênios não exercem efeitos tóxicos diretamente na glândula tireoide, mas sobre o eixo hipotálamo – hipófise, e que alterações nas concentrações dos hormônios tireoidianos podem ser decorrentes de um maior *clearance* pelo fígado, o que provavelmente não ocorreu no nosso estudo, já que os níveis de T3 total não foram alterados (LOUTCHANWOOT *et al.*, 2015).

Simmen *et al.* (2010), demonstraram que o consumo materno de dietas a base de PIS ou caseína + genisteína durante a gestação e continuada pela prole até 48 dias no período pós-natal, apresentam diferentes respostas em relação a função tireoidiana. Os animais tratados com PIS apresentaram maior expressão do receptor de hormônio tireoidiano (TR β 1), bem como da atividade das iodotironinas desidases (D1 e D2) e receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α) no fígado. O TR β 1 é a principal isoforma de receptores dos hormônios tireoidianos hepático e regulador chave de muitos genes envolvidos no metabolismo de lipídeos (HUANG *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2004; SIMMEN *et al.*, 2010).

Tanto as mães S quanto as CS apresentaram aumento de CT sérico, porém somente as mães CS aumentaram o LDL. Além disso, somente as ratas S apresentaram diminuição dos triglicerídeos em relação ao grupo C ao final da

lactação. Desta forma, apesar da dieta do grupo S apresentar conteúdo lipídico semelhante à dieta do grupo CS, as mães S apresentaram um perfil lipídico de menor risco metabólico. É possível que a presença de isoflavonas na soja seja um dos fatores que contribua para este melhor perfil lipídico, já que as isoflavonas são capazes de ativar os PPARs e aumentar a expressão de diversos genes envolvidos no catabolismo lipídico (KIM *et al.*, 2004, PARK *et al.*, 2009; FRIGOLET *et al.*, 2009; PALACIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2014), bem como aumentar a expressão dos receptores de LDL no fígado (LOVATI *et al.*, 1998). Nas ratas que consumiram PIS na lactação não evidenciamos efeitos sobre o perfil lipídico, o que pode estar relacionado ao menor conteúdo de isoflavonas da dieta PIS.

Ao analisar o leite materno das mães que consumiram soja na lactação, evidenciamos também alteração no conteúdo de CT e TG. Semelhante ao observado no soro, os níveis de CT e TG foram menores. Esses dados sugerem que a redução desses parâmetros no soro materno contribuiu para este perfil lipídico no leite. Contrariamente as mães que consumiram PIS na lactação não alteraram o perfil lipídico no soro e no leite, reforçando essa relação e o efeito da isoflavonas sobre o perfil lipídico, e divergindo da literatura que tem evidenciado que a ingestão de proteína de soja diminui a concentração de colesterol através do aumento da excreção de ácidos biliares (CARVALHO, 2014; GONZÁLEZ-GRANILLO *et al.*, 2012). Cabe ressaltar que essas alterações no leite S, pode ter contribuído para a menor massa corporal e gordura corporal total apresentada por esta prole aos 21 dias, conforme já relatado.

Em relação ao perfil lipídico da prole, observamos aos 21 dias, que ambas as proles S e PIS apresentaram menor concentração de CT. Contudo, os animais S apresentaram hipertrigliceridemia, que pode ser em decorrência da hiperleptinemia que estes animais apresentaram ao desmame, uma vez que a leptina está relacionada ao aumento da lipólise no tecido adiposo e músculo esquelético (BENNATTI & JUNIOR, 2007). De fato, foi observada redução da gordura corporal total nestes animais. Em contraste a prole CS apresentou aumento do colesterol e diminuição dos triglicerídeos, sem alterar as concentrações de leptina.

As proles S ou PIS foram programadas de forma diferente em relação aos perfil lipídico. Na prole S foi evidenciado menor CT e LDL séricos, sem alteração na trigliceridemia. Já na prole CS, cuja mãe recebeu dieta a base de caseína, mas com teor lipídico semelhante à dieta do grupo S, observou-se aumento de CT, LDL e TG séricos. Estes dados demonstram que o consumo materno de soja na lactação, foi protetor para alterações no metabolismo lipídico, que independem do teor e qualidade lipídica. É possível que as isoflavonas consumidas pela mãe e transferidas pela prole na lactação, sejam o fator chave responsável por esta programação benéfica. Os resultados evidenciados na prole PIS reforçam esta teoria, uma vez que estes animais desenvolveram hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, e a dieta PIS apresenta menor quantidade de isoflavonas, e, portanto, é transferida em menor quantidade para estes animais.

Cabe ressaltar que o presente estudo apresentou algumas limitações, como a não realização da quantificação das isoflavonas nas dietas e as dosagens do TSH sérico e estradiol no leite. Essas análises seriam interessantes para complementar e reforça a discussão dos resultados encontrados.

7. CONCLUSÃO

O consumo de soja ou proteína isolada de soja na lactação programou alterações diferentes na composição corporal da progênie, que independem do estado nutricional materno. O mesmo pode-se inferir em relação aos parâmetros hormonais e bioquímicos, sendo evidenciado modificações mais positivas com a ingestão da soja.

➤ Experimento 1:

O consumo materno de S durante a lactação programou alterações benéficas na prole em relação a composição corporal e perfil lipídico, sendo observado aumento do conteúdo mineral total, e redução dos níveis de colesterol total e LDL. Não descartamos que a maior oferta de isoflavonas da dieta soja, a diminuição materna de estradiol sérico e a hiperleptinemia na prole deste grupo, sejam fatores implicados nestes achados.

➤ Experimento 2:

O consumo materno de PIS na lactação programou efeitos negativos na composição corporal, no perfil lipídico e na homeostase glicêmica na vida adulta. As proles PIS apresentaram redução da massa proteica corporal e do conteúdo mineral total; aumento do colesterol total, dos triglicerídeos e da insulinemia. Dessa forma, o consumo de proteína isolada em fases críticas do desenvolvimento deve ser cauteloso.

Tanto a progênie S quanto a PIS foi programada para aumento dos níveis séricos de T4 livre. Como esse é o primeiro estudo a avaliar a segurança do consumo de soja e de sua proteína durante a lactação e seus efeitos sobre o organismo, mais pesquisas são necessárias para determinar as possíveis vias metabólicas envolvidas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA R.S., FLIER J.S. Leptin. *Annu. Rev Physiol*, 62:413-37, 2000

ANDERSON, JAMES W. *et al.* Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.*, v.333, p.276-282, 1995.

ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 31 de outubro de 2014.

ARAÚJO, L. F. B *et al.* Inter-relações entre as funções hormonais do ovário e da tireoide. *FEMININA*, 37(3): 143-148, 2009.

Association of Official Analytical Chemist AOAC: Official Methods of Analysis. EUA, 2000.

Association of official analytical chemists (AOAC): *Official Methods of Analysis*; 14a ed.; 1984.

BAGLIA M.L. *et al.* Soy Isoflavone intake and bone mineral density in breast cancer survivors. *Cancer Causes Control*, 26:571-580, 2015.

BARBOSA, A. C. P., *et al.* Teores de isoflavonas e capacidade antioxidanteda soja e produtos derivados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26(4): 921-926, 2006.

BARKER, D. J. In útero programming of chronic disease. *ClinSci(Lond)*, 95 (2): 115-28, 1998.

BEDANI, R. & ROSSI, E. A. Isoflavonas: Bioquímica, Fisiologia e Implicações para a Saúde. *B. CEPPA*, 23 (2): 231-264, 2005.

BENATTI, F. B. & JUNIOR A. H. L. Leptina e exercício físico aeróbio: implicações da adiposidade corporal e insulina. *Rev Bras Med Esporte*, 12(4): 263-269, 2007.

BHATHENA, S. J. & VELASQUEZ, M. T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *AM J CLIN NUTR*, 76: 1191-120, 2002.

BIANCO A. C., *et al.* Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodo thyronine seleno deiodinases. *Rev Endocr*, 23:38-89, 2002.

BIANCO, A. C. & KIM, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *Thyroid*, 15: 777 – 786, 2006.

BONOMO, I. T., *et al.* Prolactin inhibition in dams during lactation programmes for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol*, 192, 339-344, 2007.

BROWN, L. M. & CLEGG, D. J. Central effects of estradiol in the regulation of adiposity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.*, v. 112, p. 65-73, 2010.

BRYSON J.M., *et al.* Plasma insulin rise precedes rise in ob mRNA expression and plasma leptin in gold thioglucose- obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 276:358-64, 1999.

CARVALHO, H. V. M. As evidências dos benefícios do consumo das isoflavonas da soja na Saúde da Mulher: Revisão de Literatura. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, 16(4):353-9, 2014.

CEDERROTH C. R., *et al.* Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. *Mol Cell Endocrinol*, 10;321(2):152-60, 2010.

CEDERROTH C. R., NEF S. Fetal programming of adult glucose homeostasis in mice. *PLoS One*. Sep, 30;4(9):e7281, 2009.

CEDERROTH C. R., *et al.* A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice. *Environ Health Perspect*, 115(10):1467-73, 2007.

CEDERROTH C. R., *et al.* Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes*, 57(5):1176-85, 2008.

CERQUEIRA, F. M., GENNARI, M. H. M., AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim Nova*, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHANG, H. C. & DOERGE, D. R. Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect. *Toxicol Appl Pharmacol*, 168(3):244-52, 2000.

CHORAZY P. A., *et al.* Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature. *Pediatrics*, 96:148–150, 1995.

CLAPAUCH, R. *et al.* Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). *Arq Bras Endocrinol Metab*, 46 (6): 679-695, 2002.

CLEGG D. J *et al.* Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, 55(4):978–987, 2006.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, 2014. Disponível em ><http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>> Acesso em 12 de novembro de 2014.

CRAVO, C. O. Efeito a longo prazo da administração de leptina em ratos no período de lactação sobre o peso corporal e função tireóidea. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, 2002.

CRUZ, H. G. Programação do comportamento alimentar em animais desnutridos no Início da Lactação. Associação entre insulina, leptina e receptor hipotalâmico de leptina. Dissertação. (Mestrado em Ciências) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2004.

CUSIN I., *et al.* The weight reducing effect of an intracerebro-ventricular bolus injection of leptin in genetically obese rats. *Diabetes*, 45:1446-50, 1996.

DAHRI, S., *et al.* Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin-dependent diabetes. *Proc Nutr Soc*, 54(2):345-56, 1995.

DOERGE, D. R., & CHANG, H. C. Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, in vitro and in vivo. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777(1-2):269-79, 2002.

DOUGLAS, C. R. Fisiologia aplicada a nutrição. 2ª edição, Rio de Janeiro, RJ, editora Guanabara Koogan, 2006.

DUTRA, S. C. P. Metabolismo desiodativo em ratas desnutridas durante a lactação e em sua prole na idade adulta. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de mestre em Fisiopatologia Clínica e Experimental, 2002.

Dutra S. C. P., *et al.* Liver deiodinase activity is increased in adult rats whose mothers were submitted to malnutrition during lactation. *Horm Metab Res* 35: 268-270, 2003.

DUTRA, S. C.P. Efeito da exposição aguda ao frio sobre a regulação do peso corporal e da função tireóidea em animais programados pela hiperleptinemia neonatal. Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Curso de Pós graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, 2007.

ERB, R., SITARZ, N., MALVEN, P. Blood plasma and milk prolactin, and effects of sampling technique on composition of milk from suckled ewes. *J Dairy Sci*, v. 60, p.157-203, 1977.

FAGUNDES A. T. S., *et al.* Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *BJN*, 98 (5), 922–928, 2007

FERGUNSON, J. F., *et al.* Dietary isoflavone intake is associated with evoked responses to inflammatory cardiometabolic stimuli and improved glucose

homeostasis in healthy volunteers. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 24: 996 – 1003, 2014.

FERNANDEZ-TWINN, D. S. & OZANNE, S. E. Early life nutrition and metabolic programming. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1212: 78–96, 2010.

FIGUEIREDO M. S., *et al* .Flaxseed supplementation of rats during lactation changes the adiposity and glucose homeostasis of their off spring .*Life Sc*, 85 : 365 – 371, 2009.

FIGUEIREDO MS, *et al*. Maternal Flaxseed Diet During Lactation Programs Thyroid Hormones Metabolism and Action in the Male Adult Offspring in Rats. *Horm Metab Res*, 2011.

FISHBECK, K. L. & RASMUSSEN, K. M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr*, 117: 1967-1975, 1987.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. *Federal Register*, 64: 57699-733, 1999.

FORSYTHE, W. A. Soy protein, thyroid regulation and cholesterol metabolism. *J Nutr*. 125(3):619S-623S, 1995.

FORT P., *et al*. Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *J Am Coll Nutr*, 9(2):164-7, 1990.

FRANKE A. A. & CUSTER, L. J. Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clin Chem*, 42: 955–64, 1996.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, 7(12), 2011.

FRIGOLET, M. E. *et al.* White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. *JNB*, 22:118–129, 2009.

FRITZ W. A., *et al.* Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in rat. *Carcinogenesis*, 19:2151-2158, 1998.

GIORDANO, E. *et al.* Soy Isoflavones in Nutritionally Relevant Amounts Have Varied Nutrigenomic Effects on Adipose Tissue. *Molecules*, 20:2310-2322, 2015.

GLUCKMA, P. D., *et al.* Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *N Engl J Med*, 359(1): 61–73, 2008.

GODFREY, K. M. & BARKER, D. J. P. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*, 71:1344S-52, 2000.

GONZÁLEZ-GRANILLO, M. *et al.* Soy protein isoflavones differentially regulate liver X receptor isoforms to modulate lipid metabolism and cholesterol transport in the liver and intestine in mice. *Diabetologia* 55:2469–2478, 2012.

HANLEY B, *et al.* Metabolic imprinting, programming and epigenetics - a review of present priorities and future opportunities. *Br J Nutr*, 104(1):S1–25, 2010.

HUANG, W. *et al.* Soy protein isolate increases hepatic thyroid hormone receptor content and inhibits its binding to target genes in rats. *J Nutr*, 135(7): 1631-1635, 2005.

IKEDA T., *et al.* Dramatic synergism between excess soybean intake and iodine deficiency on the development of rat thyroid hyperplasia. *Carcinogenesis* 21: 707–713, 2000.

JAHAN-MIHAN, A. *et al.* Soy protein–based compared with casein-based diets fed during pregnancy and lactation increase food intake increase food intake and characteristics of metabolic syndrome less in female than male rat offspring. *Nutr Res*, 31: 644–651, 2011a.

JAHAN-MIHAN, A., SMITH, C. E., ANDERSON, H. Effect of protein source in diets fed during gestation and lactation on food intake regulation in male offspring of Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300:1175–1184, 2011b.

JANG, E. H. *et al.* Novel black soy peptides with antiobesity effects: activation of leptin-like signaling and AMP-activated protein kinase. *Int J Obes*, 32:1161–1170, 2008.

JEFFERSON, W., *et al.* Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod*, 74:161–168, 2006.

JUNGBAUER, A. & MEDJAKOVIC, S. Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 139: 277-289, 2014.

KAJIYA, H., *et al.* Dietary soybean enhances Pit-1 dependent pituitary hormone production in iodine deficient rats. *J Mol Histol.* 36(4):265-74, 2005.

KAVANAGH, K., *et al.* High isoflavone soy diet increases insulin secretion without decreasing insulin sensitivity in premenopausal nonhuman primates. *Nutr Res* 28: 368–76, 2008.

KIM, S. *et al.* Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR. *MCE*, 220: 51–58, 2004.

KIM, S., SHIN, H.J., KIM, S.Y., KIM, J.H., LEE, Y.S., KIM, D.H., LEE, M.O. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acids catabolism through activation of PPAR alpha. *MCE*, v. 220, p. 51–58, 2004.

KIMURA, E. T. Glândula Tireoide. In: Margarida de Mello Aires. (Org.). Fisiologia. 4ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, v.1: 1055-1078, 2012.

KOLACZYNSKI J.W., *et al.* Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *Nm*, 81:4162-5, 1996

KOLETZKO, B., *et al.* Programming research: where are we and where do we go from here. *Am Clin Nutr*, 94: 2036S – 43, 2011.

KOSTELAC, D., *et al.* Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem*, 51:7632–7635, 2003.

LAKER, R. C. WLODEK, M. E. CONNELLY, J. J. YAN, Z. Epigenetic origins of metabolic disease: The impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences. *Food Science and Human Wellness* 2: 1–11, 2013.

LEHRAIKI, A. *et al.* Genistein impairs early testosterone production in fetal mouse testis via estrogen receptor alpha. *Toxicology in Vitro*, 25: 1542–1547, 2011.

LIBRENTI, M.C. *et al.* Effect of soya and cellulose fibers on postprandial glycemic response in type ii diabetic patients. *Diabetes Care*, 15(1):111-3, 1992.

LINZ, A. L., *et al.* Feeding of soy protein isolate to rats during pregnancy and lactation suppresses formation of aberrant crypt foci in their progeny's colons: interaction of diet with fetal alcohol exposure. *Journal of Carcinogenesis*, 3:14, 2004.

LISBOA P. C., *et al.* Increased 5'-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptive mechanism in response to protein restriction during lactation. *J Endocrinol*, 177: 261-267, 2003.

LISBOA, P. C., *et al.* Neonatal Low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult Rats. *Exp Biol Med*, 233:57, 2008.

LIU M., *et al.* Dual effects of daidzein, a soy isoflavone, on catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *Endocrinology*, 148(11):5348-54, 2007.

LOPES, H. J. J. Função tireoidiana: Principais teste laboratoriais e aplicações diagnósticas. Analisa diagnósticos Ltda, Belo Horizonte – MG, 2002.

LOUTCHANWOOT, P., SRIVILAI, P., JARRY, H. The influence of equol on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and hepatic lipid metabolic parametrs in adult male rats. *Life Sciences*, (128): 1-7, 2015.

LUNARDELLI, E. A. R., *et al.* Effects of thryroid hormones on memory and on Na⁺ , K⁺-ATPase activity in rat brain. *Current Neurovascular Research*, 4 (3), 2007.

MAIA, A. L., *et al.* Effect of 3,5,3'-triiodothyronine (T3) administration on dio1gene expression and T3 metabolism in normal and type 1 deiodinase-deficient mice. *Endocrinology*, 136:4842-9,1995.

MAIA, A. L., *et al.* Type 2 iodothyroninedeiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest*, 115: 2524-33, 2005.

MEYER, E. L. S., WAGNER, M. S., MAIA, A. L. Expressão das iodotironinasdesiodases nas neoplasias tireoidianas. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 51 (5): 690 – 700, 2007.

MOURA E. G. & PASSOS M. C. F. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep*, 25 (3/4): 251-269, 2005.

MOURA E. G., *et al.*Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats - the role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res*, 40(1):1-7, 2008.

MURRAY, R. K. *et al.* Harper's illustrated biochemistry. 26th edition. International edition, the McGraw-Hill Companies, 2003.

NAGASAWA, A. *et al.* Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311:(2003) 909–914, 2003.

NAGATA, C. *et al.* Associations among maternal soy intake, isoflavone levels in urine and blood samples, and maternal and umbilical hormone concentrations (Japan). *Cancer Causes Control*, 17:1107–1113, 2006.

NORIEGA-LÓPEZ, L., *et al.* Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *J Biol Chem*, 282(28): 20657-66, 2007.

NOWAK K. M., *et al.* Rat thyroid gland expresses the long form of leptin receptors, and leptin stimulates the function of the gland in euthyroid non-fasted animals. *Int. J. Mol. Med*, 9(1): 31-34, 2002.

PALACIOS-GONZÁLEZ, B. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841: 132–140, 2014.

PARK, H J. *et al.* Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20:140–148, 2009.

PASSOS M. C. F., *et al.* Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res*, 34(1):40-43, 2002.

PASSOS, M. C. F. Maternal leptin treatment during lactation programs the thyroid function of adult rats. *Life Sciences*, 80: 1754–1758, 2007.

PASSOS, M. C. F., *et al.* Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Hormone Metabolic Research*, 36: 625-9, 2004.

PASSOS, M. C. F., *et al.* Increase of T3 secreted through the Milk in protein restricted lactating rats. *Nutrition Research*, 21: 917-924, 2001.

PENHA, L. A. O., *et al.* A soja como alimento: valor Nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. *B. CEPPA*, 25 (1): 91-102, 2007.

PERON, A. P., *et al.* Utilização das isoflavonas presentes na soja (Glycinemax (L) Merrill) na prevenção e tratamento de doenças crônicas, uma breve revisão. *Arq Mudj*, 12(2.3):51-57, 2008.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83: 346-356, 1977.

PFAEHLER, A. *et al.* Regulation of adiponectin secretion by soy isoflavones has implication for endocrine function of the testis. *Toxicology Letters*, 209: 78–85, 2012.

PHIPPS, W. R., *et al.* Lack of effect of isoflavonic phytoestrogen intake on leptin concentrations in premenopausal and postmenopausal women. *FERTILITY & STERILITY*, 75 (6): 1059 - 1064, 2001.

RAMOS, C. F., *et al.* Thyroid function in post-weaning rats whose dams were fed a low-protein diet during suckling. *Braz J Med Biol Res*, 30(1):133-7, 1997.

ROSSI, E. A. *et al.* Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja*. *Alim. Nutr*, 15 (2): 93-99, 2004.

RUHLEN, R. *et al.* Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the “fetal estrogenization syndrome” and obesity in cd-1 mice. *Environmental Health Perspective*, 116 (3), 2008.

SANTOS, M. C. S. *et al.* Impacto of flavonoids on thyroid function. Food and Chemical Toxicology. *Journal of Chromatography B*, 777: 269–279, 2011.

SETCHELL, K. D., *et al.* Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*, 131:1362S-1375S, 2001.

SIMÃO, A. N. C., BARBOSA, D. S., NUNES, I. B., Godeny, P., Lozovoy, M. A. B., Dichi, I. Importância da ingestão de soja nos sintomas do climatério, osteoporose e doenças cardiovasculares. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 12(1): 67-75, 2008.

SIMMEN F. A., *et al.* Soy protein diet alters expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2: 1106–1113, 2010.

SOARES L. L., LUCAS A. M., BOAVENTURA G. T. Can organic and transgenic soy be used as a substitute for animal protein by rats? *Braz J Med Biol Res*, 38:583–586, 2005.

SOSIĆ-JURJEVIĆ, B. *et al.* Orchidectomy of middle-aged rats decreases liver deiodinase 1 and pituitary deiodinase 2 activity. *J. Endocrinol*, 215: 47–56, 2012.

SOSIĆ-JURJEVIĆ, B. *et al.* Soy isoflavones interfere with thyroid hormone homeostasis in orchidectomized middle-aged rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278: 124–134, 2014.

SZKUDELSKI, T. Genistein restricts leptin secretion from rat adipocytes. *J Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 96: 301–307, 2005.

TACO- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos . 4ª edição, Campinas – SP, 2011. Disponível em http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf Acesso em 15 de setembro de 2014.

TAYLOR, H., *et al.* Phytoestrogens alter hypothalamic calbindin-D levels during prenatal development. *Developmental Brain Research*, 114: 277–281, 1999.

TEEDE, H.J. *et al.* Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metabolism*, 86 (7): 3053-3060, 2001.

TEIXEIRA, C. V., *et al.* Leptin injection during lactation alters thyroid function in adult rats. *Horm Met Res*, 35 (6): 367-371, 2003.

TODAKA, E., *et al.* Fetal exposure to phytoestrogens – The difference in phytoestrogen status between mother and fetus. *Environmental Research*, 99: 195–203, 2005.

TORRE-VILLALVAZO, I. *et al.* Soy Protein Ameliorates Metabolic Abnormalities in Liver and Adipose Tissue of Rats Fed a High Fat Diet¹⁻³. *The Journal of Nutrition*, 138: 462–468, 2008.

TORREZAN R. GOMES, R. M. FERRARESE, M. L., DE MELO, F. B. RAMOS, A. M. D. MATHIAS, P. C. F., SCOMPARIN, D. X. O tratamento com isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. *Arq Bras Endocrinol Metb*, 52-9, 2008.

TOSTE F. P., *et al.* Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr*, 95: 830-837, 2006a.

TOSTE F. P., *et al.* Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm Metab Res* 38: 827-831, 2006b.

TOU, J. C. L.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Dose, timing, and duration of flaxseed exposure affect reproductive indices and sex hormones levels in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 56: 555 – 570, 1999.

TOU, J. C. L.; CHEN, J.; THOMPSON, L.U. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. *Journal of Nutrition*, 128:1861-1868, 1998.

TOUSEN Y., *et al.* Effects of genistein, an isoflavone, on pregnancy outcome and organ weights of pregnant and lactating rats and development of their suckling pups. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*,. 52(3):174-82, 2006.

TREVENZOLLI, I. H., *et al.* Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Horm Metabo Res*, 42: 1-9, 2010.

TROINA A. A., *et al.* Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the offspring body composition, lipid profile and sexual function. *Food Chem Toxicol*, 48: 697 – 703, 2010.

VANASSCHE F. A., AERTS L. Long-term effect of diabetes and pregnancy in the rat. *Diab*, (34):116-8, 1995.

VELASQUEZ, M. T., BHATHENA, S. J. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci*, 4(2):72-82, 2007.

WAGNER J. D *et al.* Effects of soy protein and isoflavones on insulin resistance and adiponectin in male monkeys. *Metabolism*, 57(7): S24–S31, 2008.

WAJNER, S. M., *et al.* O papel dos hormônios tireoidianos na função testicular. *Rev. HCPA*, 28 (1): 41-8, 2008.

WALKER C.G., *et al.* Insulin determines leptin responses during a glucose challenge in fed and fasted rats. *Int J Obes*, 29(4):398-405, 2005.

XIAO, C. W., *et al.* Dietary Soy Protein Isolate and Isoflavones Modulate Hepatic Thyroid Hormone Receptors in Rats. *The Journal of Nutrition*, 134: 743–749, 2004.

YAMADA. Y. *et al.* Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302: E433–E440, 2012.

YANAGISAWA. M. *et al.* Genistein and daidzein, typical soy isoflavones, inhibit TNF α -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res*, 56:1783–1793, 2012.

YANG, H. Soy isoflavones modulate adipokines and myokines to regulate lipid metabolism in adipose tissue, skeletal muscle and liver of male Huanjiang mini-pigs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 365: 44–51, 2012.

YEN, P. M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *The American Physiological Society*, 81 (3): 1097- 1126, 2001.

ZHAN, S. & HO, S. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 397-408, 2005.

ZHANG, J. & LAZAR M. A. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 62: 439-466, 2000.