



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

O EFEITO FUNCIONAL DO EXTRATO DE SOJA E DA ISOFLAVONA ISOLADA NO INFARTO DO MIOCÁRDIO

**CURITIBA
2010**

ANA CRISTINA MIGUEZ TEIXEIRA

**O EFEITO FUNCIONAL DO EXTRATO DE SOJA E
DA ISOFLAVONA ISOLADA NO INFARTO DO
MIOCÁRDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde, área de concentração: medicina e áreas afins.

Orientador: Prof^o Dr. Luiz César Guarita Souza.

**CURITIBA
2010**

**Às minhas filhas, Camila Miguez
Ribeiro e Isabela Miguez Ribeiro, que
estiveram sempre presentes e são a razão da
minha vida !!!**

**À minha mãe Alzira Miguez
Teixeira (*in memoriam*) que sempre
me ensinou que é através do
conhecimento que se traz liberdade à
alma !!!**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza, por estar sempre presente nas horas mais difíceis do desenvolvimento desta tese, passando seu conhecimento sem medir esforços, pela paciência e otimismo próprios de um Mestre e por acreditar em mim durante todo o processo.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues, pela competência e seriedade que lhe são peculiares, sempre mostrando-me o caminho nos momentos mais difíceis da minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila que leu meu projeto, emitiu opiniões e elogios e, como sempre, me incentivou...ele, há muitos anos, ensina-me o significado da paixão pela pesquisa.

Ao Júlio C. Francisco, pela sua dedicação, competência e participação em todos os procedimentos práticos relativos a esta pesquisa, garantindo o rigor metodológico da mesma.

Aos funcionários do biotério da PUCPR, em especial ao responsável técnico do biotério, Rafael Zotz, que, como sempre, tratou dos animais com todo o respeito e cuidado que são necessários para o bom desenvolvimento das metodologias e proteção dos animais.

À Prof^a Dra Márcia Olandoski, pela sua ajuda nas análises estatísticas, sempre demonstrando calma e, acima de tudo, sendo uma amiga nas horas mais difíceis.

À OLVEBRA, que forneceu todo o extrato de soja utilizado durante todo o processo.

À ADM, que forneceu a isoflavona isolada para todos os experimentos.

À EMBRAPA, que através do pesquisador José Marcos Gontijo Mandarino, realizou a análise da soja, através do HPLC, e emitiu o cromatograma com a quantidade e tipo de isoflavonas no extrato de soja utilizado.

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Operatória da PUCPR que auxiliaram em todos os procedimentos metodológicos.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica, Dr^a Lúcia Noronha, Ana Paula Camargo Martins e alunas que realizaram os procedimentos para as análises histológicas.

Ao Laboratório de Estomatologia, especialmente ao professor Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa, pelo empréstimo da balança de precisão para a pesagem da isoflavona e do extrato de soja.

Ao Laboratório de Bioquímica que, através dos técnicos José Marcelo Camargo e Ana Paula Gaiovis, tornaram possível os procedimentos de coleta de sangue dos animais, emprestando pipetas e centrífuga.

Ao Laboratório de Parasitologia da PUCPR da Professora Gracinda Oliveira e da técnica Rosana Maron Athayde, que auxiliaram através do empréstimo da centrífuga.

Às Professoras Dr^a. Vanete Soccol, Dr^a. Rosângela Clara Paulino e Dr^a. Edilene Alcântara de Castro, do Laboratório de Patologia Básica da UFPR, pela colaboração e parceria.

Aos alunos participantes do Curso de Medicina e Nutrição da PUCPR, sem os quais os procedimentos metodológicos da gavagem, e demais coletas de material, não teriam sido possíveis...a dedicação e comprometimento de todos eles foi fundamental para a qualidade e seriedade metodológica da nossa pesquisa !!!

Alunos do Curso de Medicina:

André Akio Minamihara
Andréia de Deus Bueno
Bianca Garcez Massignan
Bruno Francisco Dias
Camila Speltz Perussolo
Daniel Barreto Ramos
Erickson Danilo Padovani
Fabiane Mitie Osaku
James Ken Fukuda
Marcela Muzolon
Mariah Rodrigues Paulino
Priscilla Miwa Kumode (aluna do Pibic Jr)
SaymonRegisSantana

Alunos do Curso de Nutrição:

Adriana Mara Lopes Santos
Denise Kawski
Joselayne Corrêa dos Santos
Paulo Victor Gomes Modanêsi

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
5 MATERIAL E MÉTODO	24
5.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	24
5.2 INDUÇÃO DO INFARTO.....	24
5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
5.4 ANÁLISE DO PESO.....	28
5.5 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA.....	28
5.6 CONTROLE DA INGESTÃO DE RAÇÃO.....	29
5.7 EUTANÁSIA.....	29
5.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	30
5.9 HISTOPATOLOGIA.....	31
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
6 RESULTADOS	33
6.1 ANÁLISE DO PESO.....	33
6.2 INGESTÃO DA RAÇÃO.....	34
6.3 MORTALIDADE.....	35
6.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	36
6.5 HISTOPATOLOGIA.....	39
6.6 ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS.....	43
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÕES	54
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
10 ANEXOS	63
10.1 ANEXO 1. CROMATOGRAMA DA EMBRAPA.....	64
10.2 ANEXO 2. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DA ISOFLAVONA.....	68
11 APÊNDICE	74
11.1 CARTAS DE APROVAÇÃO DO CEUA PUCPR.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

α -KGDH	Alfa-cetoglutarato desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARG: E.C	<i>Arginase Enzyme Classification</i>
AST	Aspartato aminotransferase
AVE	Acidente vascular encefálico
BEC	Cloreto de boronoetil
C	Grupo controle
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso com Animais
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CK	Creatina quinase
CK-MB	Creatina quinase – Fração MB
DATASUS	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
DMBA	7,12 – dimetilbenzo (alfa) antraceno
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ES	Extrato de soja / Grupo extrato de soja
FAO/WHO	<i>Food and Agriculture Organization / World Health Organization</i>
FC	Frequência cardíaca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fração de ejeção
HDL	<i>Hight density lipoprotein</i>
HE	Hematoxilina-eosina
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICDH	Isocitrato desidrogenase
IF	Isoflavona / Grupo isoflavona
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IPM	Índice de performance miocárdica
LDH	Lactato desidrogenase

LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LSD	<i>Least square difference</i>
MDH	Malato desidrogenase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
PDCAAS	<i>Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score</i>
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SDH	Succinato desidrogenase
SOD	Superóxido dismutase
VDF	Volume diastólico final
VSF	Volume sistólico final

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das principais isoflavonas de soja.....	17
Figura 2 – Cromatograma com a expressão dos diferentes tipos de IF no ES	27
Figura 3 - Análise comparativa do peso final para os três grupos.....	33
Figura 4 - Expressão da atividade da Arginase para os três grupos	36
Figura 5 - Expressão da atividade da LDH para os três grupos.....	37
Figura 6 - Expressão da atividade da MDH para os três grupos.....	38
Figura 7 – Expressão de colágeno maduro e imaturo do grupo controle.....	39
Figura 8 – Expressão de colágeno maduro e imaturo do grupo IF.....	40
Figura 9 – Expressão de colágeno maduro e imaturo do grupo ES.....	40
Figura 10 - Análise comparativa da frequência cardíaca para os três grupos.....	43
Figura 11 – Análise comparativa da fração de ejeção para os três grupos.....	44
Figura 12 – Análise comparativa do volume sistólico para os três grupos.....	45
Figura 13 – Análise comparativa do volume diastólico final para os três grupos.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise do peso para os três grupos.....	34
Tabela 2 – Análise da ingestão de ração para os três grupos.....	34
Tabela 3 - Mortalidade durante o experimento.....	35
Tabela 4 - Valores de p para a expressão da atividade de LDH nos três grupos.....	37
Tabela 5 - Valores de p para a expressão da atividade de MDH nos três grupos.....	38
Tabela 6 - Análise dos dois tipos de colágeno e colágeno total para os três grupos.....	41
Tabela 7 - Valores de p para a expressão da quantidade de colágeno maduro encontrado nos três grupos.....	42
Tabela 8 – Valores de p para a expressão da quantidade de colágeno total encontrado nos três grupos.....	42

RESUMO

Fundamentação: O infarto agudo do miocárdio (IAM) é um problema de saúde coletiva com altos índices de morbi-mortalidade e de relevância do ponto de vista clínico epidemiológico. O alimento funcional, como a soja, que contém isoflavonas (IF), é tratamento alternativo nas doenças cardiovasculares. **Objetivo:** analisar os efeitos funcionais e anátomo-patológicos do extrato de soja (ES) e da IF pós-infarto do miocárdio. **Material e Método:** quarenta e um ratos Wistar com peso médio de 300 gramas foram induzidos ao IAM. Cinco dias após, os animais foram submetidos à ecocardiografia para identificação da frequência cardíaca (FC, btm), fração de ejeção (FE%), volume sistólico (VSF, ml) e diastólico finais (VDF, ml) do ventrículo esquerdo. Os animais com fração de ejeção acima de 45% foram excluídos do estudo. A partir deste momento, os animais foram randomizados e divididos em três grupos: controle (n=14), ES (n=15) e IF (n=12). Todos os grupos receberam água e ração sob livre demanda. O grupo IF recebeu 120mg/kg/dia de IF isolada e o grupo ES 12,52 g/dia, ambos por meio de gavagem. Trinta dias após o infarto do miocárdio, os animais foram submetidos a uma nova ecocardiografia para avaliação dos mesmos parâmetros. Após, os animais foram eutanasiados e foi realizada a análise histológica para quantificação e qualificação do tipo de colágeno. Os animais foram pesados e o músculo cardíaco foi congelado em nitrogênio líquido para aferição da atividade dos marcadores bioquímicos (Arginase, LDH e MDH). **Resultados:** Com relação ao peso, identificou-se um acréscimo desta variável em todos os grupos, sendo que o grupo IF apresentou um ganho de peso maior em relação ao grupo controle ($p=0.030$) e ao grupo ES ($p<0.001$). Houve uma menor atividade argininolítica no grupo ES. Identificou-se uma maior atividade de LDH no grupo ES, e de MDH no grupo IF, ambos com significância estatística. Foi identificada uma menor quantidade de colágeno maduro na região próxima ao infarto do miocárdio no grupo ES. Com relação à FC, identificou-se uma diminuição no grupo ES (269 vs 219btm, $p=0.020$) e um aumento no grupo IF (232 vs 237btm, $p=0.624$). Os animais do grupo controle, IF e ES apresentaram uma diminuição de FE após trinta dias do infarto (40.38 vs 38.33%, $p=0.432$, 39.42 vs 32.91%, $p=0.017$ e 36.77 vs 34.17%, $p=0.320$, respectivamente). Com relação ao VSF foi identificado um acréscimo dos parâmetros nos três grupos (0.31 vs 0.43ml, $p=0.009$, 0.24 vs 0.45ml, $p=0.001$ e 0,36 vs 0.41ml, $p=0.140$ respectivamente), assim como na análise do VDF (0.53 vs 0.69ml, $p=0.003$, 0.44 vs 0.61ml, $p=0.008$ e 0.57 vs 0.63ml, $p=0.205$ respectivamente). **Conclusão:** identificou-se um efeito protetor no grupo ES após trinta dias do infarto do miocárdio em consequência de uma menor queda da FE e menor aumento dos volumes sistólicos e diastólicos finais do ventrículo esquerdo, além de uma diminuição de frequência cardíaca, um aumento dos níveis de LDH e diminuição dos valores de MDH, sugerindo alteração do perfil metabólico energético no grupo ES. Uma menor quantidade de colágeno maduro, próximo ao infarto, para o grupo ES, sugerindo maior capacidade de reperfusão do músculo cardíaco nesta região.

Palavras-chave: isoflavona, soja, infarto agudo do miocárdio, disfunção ventricular, alimentos funcionais, arginase, LDH, MDH, pesquisa experimental com ratos Wistar.

The effect functional of soybean extract and isolated isoflavone on myocardial infarction

ABSTRACT

Background: Acute myocardial infarction (AMI) is a public health problem with high morbi-mortality levels and is very important from the clinical epidemiology point of view. Function food, such as soybean, which contains isoflavones (IF), is an alternative treatment in cardiovascular diseases. **Objective:** to analyze the functional and anatomopathological post-myocardial infarction effects of soybean extract (SE) and IF. **Materials and Methods:** AMI was induced in forty-one Wistar rats of average weight 300 grams. Five days later, the animals were given an echocardiogram to determine their Heart Rate (HR, bpm), ejection fraction (EF%), final systolic volume (ESV, ml) and final diastolic volume (EDV, ml) of the left ventricle. Animals with an ejection fraction greater than 45% were excluded from the study. The animals were randomized and then divided into three groups: control (n=14), SE (n=15) and IF (n=12). All the groups were given water and feed on demand. The IF group received 120 mg/kg/day isolated isoflavone and the SE group 12.52 g/day, both via gavage. Thirty days after the myocardial infarction, the animals were given another echocardiogram to assess the same parameters. The animals were subsequently sacrificed and a histological exam was carried out to determine the quantity and quality of collagen. The animals were weighed and the feed intake was controlled throughout the entire procedure and the cardiac muscle was frozen in liquid nitrogen to test for biochemical markers activity (Arginase, LDH and MDH). **Results:** In regard to weight, an increase in this variable was found in all groups, the IF group showing a greater weight gain in relation to the control group (p=0.030) and the SE group (p<0.001). There was a lower arginase's activity in group SE. Furthermore, not only was there a greater activity of LDH in the ES group but a greater quantity of MDH in the IF group also; both groups with statistical significance. A smaller quantity of mature collagen was found in the region proximal to the myocardial infarction in the SE group. Concerning HR, a reduction was found in the SE group (269 vs. 219 bpm, p=0.020) and an increase in the IF group (232 vs. 237 bpm, p=0.624). The animals of the control, IF and SE groups showed a reduction in EF thirty days after the infarction (40.38 vs. 38.33%, p=0.432; 39.42 vs. 32.91%, p=0.017 and 36.77 vs. 34.17%, p=0.320, respectively). In regard to the ESV, an increase was observed in the parameters of the three groups (0.31 vs. 0.43 ml, p=0.009; 0.24 vs. 0.45 ml, p=0.001 and 0.36 vs. 0.41 ml, p=0.140, respectively) and also in the analysis of the EDV (0.53 vs. 0.69 ml, p=0.003; 0.44 vs. 0.61 ml, p=0.008 and 0.57 vs. 0.63 ml, p=0.205, respectively). **Conclusion:** Due to a slightly lower EF, a reduced increase of systolic and diastolic volumes in the left ventricular, a significant decrease in cardiac frequency as well as an increase in LDH levels and a decrease in MDH, an alteration in the energy metabolic profile was suspected in the ES group. Also, a reduced quantity of mature collagen was found close to the infarct in this particular group, suggesting a greater chance of reperfusion of the cardiac muscle in this region.

Key words: isoflavone, soybean, acute myocardial infarction, ventricular dysfunction, functional foods, arginase, LDH, MDH, experimental research with Wistar rats.

1 INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é um evento grave que requer atendimento imediato e internação e que se baseia, para ser diagnosticado, nos parâmetros de história clínica, evolução eletrocardiográfica e marcadores de necrose ¹. A Sociedade Brasileira de Cardiologia possui diretrizes para manuseio dos indivíduos com IAM. Os métodos terapêuticos têm a sua eficácia comprovada cientificamente e garantem que estes indivíduos tenham o tratamento adequado, em tempo hábil ^{2,3}.

O IAM é um problema de saúde coletiva, com altos índices de morbimortalidade e de relevância do ponto de vista clínico epidemiológico ⁴. Segundo o DATASUS, no Brasil, as doenças cardiovasculares representam a primeira causa de mortalidade, sendo responsáveis por, aproximadamente, 30% dos óbitos e o quarto motivo para internação hospitalar, correspondendo a 10,22% no ano de 2007. No ano de 2006, foram registrados 90.644 casos de doença isquêmica do coração, alcançando taxa média de mortalidade no Brasil de 48,50/100.000 habitantes ⁵.

Nos Estados Unidos, 25% das mortes são conseqüências do IAM, o que representa um número de um milhão e quinhentos mil indivíduos a cada ano. Um em cada 25 pacientes que tem alta hospitalar morre no primeiro ano pós-infarto. A mortalidade pós-infarto é diferente conforme a idade, sendo maior nas faixas etárias mais avançadas ⁶.

Um problema de saúde coletiva, que é responsável pelo óbito de um número significativo de indivíduos, requer tratamentos eficazes e, muitas vezes, alternativos. Os alimentos funcionais têm sido foco de atenção para tratamento alternativo destas doenças e estudos realizados pela comunidade científica vêm, a cada dia, demonstrando que esta hipótese é uma realidade.

A soja, que contém isoflavonas (IF) e proteína, é considerada um alimento funcional. A funcionalidade dos alimentos é fato conhecido de longa data, pois, em 2500 a.C, Hipócrates (460-377 a.C) já dizia, “que o teu alimento seja o teu remédio e que o teu remédio seja o teu alimento”. Ele sabia da

importância do alimento para o bom desenvolvimento do ser humano e para a preservação da saúde, bem como para a manutenção da qualidade de vida de um indivíduo. É claro que, ainda que de maneira empírica, esta afirmação já causava um forte impacto junto àqueles que se preocupavam com o bem-estar do ser humano. Hoje, o desenvolvimento de alimentos funcionais figura em âmbito internacional. O papel dos fatores relativos à terapia nutricional na prevenção das principais doenças crônico-degenerativas, tendo o câncer como a mais importante, está sob intensa pesquisa na comunidade científica.

Nagata e colaboradores afirmaram que os níveis de colesterol sérico em homens e mulheres japonesas diminuíram quando a ingestão de produtos de soja era elevada e Anthony comprovou a diminuição dos níveis de colesterol e prevenção de doenças cardiovasculares em seu estudo ^{7, 8}.

Uma pesquisa realizada por Ma e colaboradores, em modelos experimentais (ratos), onde a miocardiopatia dilatada foi induzida pela adriamicina, sugeriram que o efeito da IF, em concentração de 120 mg/Kg/dia, diminuiu o efeito tóxico da adriamicina no miocárdio, aumentando, conseqüentemente, a contratibilidade cardíaca, resultando em melhor recuperação da função ⁹.

Em estudo realizado por Lin e colaboradores, em modelo de infarto do miocárdio realizado através da ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, o uso do resveratrol, que é considerado um alimento funcional, foi capaz de reduzir o tamanho do infarto e aumentar a função ventricular, agindo como um potente agente cardioprotetor ¹⁰.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares têm acometido, a cada dia, um número maior de indivíduos em todo o mundo e constitui-se um problema de saúde coletiva preocupante.

O interesse da comunidade científica em encontrar novos tratamentos e tratamentos alternativos é grande, visto que o objetivo principal da atuação da equipe multiprofissional de saúde é proporcionar qualidade de vida para a população em geral.

Os alimentos funcionais vêm sendo amplamente estudados como uma destas alternativas, não apenas na medicina profilática como também na terapêutica.

Existem pesquisas científicas que sugerem resultados positivos, melhorando a recuperação pós-infarto do miocárdio com o uso de alimentos funcionais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito funcional e anátomo-patológico do extrato de soja (ES) e isoflavona (IF) isolada no infarto do miocárdio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar o peso dos animais entre os grupos IF, ES e controle, no período de trinta dias após o infarto do miocárdio e seus valores basais.

Comparar os valores de Arginase, LDH e MDH entre os grupos IF, ES e controle, após trinta dias do infarto do miocárdio.

Avaliar a quantidade e qualidade de colágeno, maduro e imaturo, na região peri-infarto nos grupos ES e IF após trinta dias do infarto do miocárdio.

Comparar a frequência cardíaca dos animais entre os grupos IF, ES e controle, no período de trinta dias após o infarto do miocárdio e seus valores basais.

Comparar a fração de ejeção, volumes sistólicos e diastólicos finais do ventrículo esquerdo entre os grupos IF, ES e controle, no período de trinta dias após o infarto do miocárdio e seus valores basais.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo alimentos funcionais foi, primeiramente, introduzido no Japão em meados dos anos 80 e refere-se aos alimentos contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo, além de serem nutritivos. Recentemente, muitos cientistas de alimentos e profissionais da indústria têm demonstrado crescente interesse nestes alimentos, que desempenham um papel benéfico para a saúde e que são reconhecidos pela ciência na prevenção e manutenção da saúde, na redução dos riscos de doenças crônico-degenerativas e nas modificações benéficas das funções fisiológicas ¹¹.

Como conseqüência, o mercado desta categoria de alimentos está expandindo e movimenta milhões de dólares no mundo inteiro, com destaque para alguns países como o Japão e os Estados Unidos e a tendência é que ele cresça ainda mais. A razão para isto é a preocupação das pessoas em manter um estilo de vida saudável e melhorar sua qualidade de vida. Além disso, a elevada taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer nos países industrializados tem levado os consumidores a buscar este tipo de produto.

Alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos contendo em sua composição alguma substância biologicamente ativa que, ao ser incluída em uma dieta usual, modula processos metabólicos ou fisiológicos, resultando em redução dos riscos de doença e promovendo manutenção da saúde ¹². Tais produtos podem variar de nutrientes isolados, produtos derivados de biotecnologia, suplementos dietéticos a alimentos geneticamente modificados, além de alimentos processados e derivados de plantas.

Os alimentos funcionais contêm substâncias que podem ser carotenóides, compostos fenólicos, fitoesteróis e fitoestanóis, tocotrienóis, compostos organosulfurados e carboidratos não digeríveis. Alguns já foram estudados em profundidade e seus efeitos funcionais comprovados. O brócolis e demais crucíferos são alimentos funcionais, assim como a aveia, linhaça, tomate, frutas cítricas, amoras, chás, uva, vinho e alho, além da soja ¹³.

A soja tem composição nutricional quase completa, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e muitas vitaminas e minerais. Seu valor calórico é alto,

com a vantagem de não resultar de grande quantidade de amido. Ela contém, aproximadamente, 34% de carboidratos. Suas fibras estão contidas, quase que totalmente, em sua casca. Cerca de 90% das proteínas da soja são globulinas, glicinina e conglicinina, que constituem uma mistura de macromoléculas de frações protéicas, densidades de carga e estruturas diferentes que podem ser separadas por ultracentrifugação. O óleo da soja contém cerca de 15% de ácidos-graxos saturados e 85% de insaturados, sendo grande seu conteúdo de ácidos-graxos essenciais. Os lipídeos da soja incluem, ainda, 1 a 3% de substâncias não saponificáveis como os esteróides, tocoferóis e a vitamina A.

A disponibilidade destes componentes é maior quando se ingerem os brotos da soja. Enquanto imatura, é boa fonte de riboflavina, niacina e ácido ascórbico. Quando madura, é ótima fonte das vitaminas E e K, tiamina, riboflavina e ácido fólico. Apresenta elevado teor de lisina, fator que distingue a proteína da soja da maioria das proteínas vegetais, leucina, isoleucina e L-arginina. O conteúdo de triptofano é baixo e não é boa fonte de aminoácidos sulfurados, assim como a metionina e a cisteína, tornando-a uma fonte limitante destes aminoácidos. Porém, suas proteínas se complementam ao se combinarem com as proteínas de cereais ingeridas na dieta, gerando uma proteína quase tão completa quanto à de origem animal.

Os açúcares livres correspondem a 8% do total de carboidratos, sendo que, destes, há 60% de sacarose, 4% de rafinose e 36% de estaquiose. É rica em muitos minerais, em especial magnésio, fósforo, ferro, cobre, zinco e uma fonte moderada de cálcio. O extrato de soja possui um valor calórico de 459 Kcal/100 g do produto e, quando reconstituído, como leite de soja, 52 Kcal/100 ml. Em relação aos macronutrientes, possui 28,5 g de carboidratos, 35,7 g de proteínas, 26,2 g de gorduras totais (excelente fonte de ácidos graxos essenciais), 7,3 g de fibras. A umidade é de, aproximadamente, 4,5 %. Em relação aos micronutrientes, possui vitamina B1 (40 mg) de vitamina B2 (120 mg), além de minerais como Ca (40 mg), Fe (1,2 mg), Na (45 mg), K (105 mg)

14, 15

Em 1991, a FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization / World Health Organization*), através de um estudo realizado com o método PDCAAS (*Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score*), considerou a proteína das leguminosas, mais especificamente a da soja, como sendo a proteína “padrão

ouro” para o reino vegetal, pois é a que mais se aproxima, em termos nutricionais, da proteína de alto valor biológico, ou seja, a proteína de origem animal, sendo a albumina a mais importante ¹⁶. Em 1999, a FDA (*Food and Drug Administration*) reconheceu a soja, na quantidade de 25 g/dia, como alimento que, associado à dieta com baixos níveis de gordura saturada, baixa os níveis de colesterol e reduz o risco de doenças cardiovasculares ¹⁷.

Estudos científicos sugerem, a nível mundial, que a soja pode ter efeito benéfico na prevenção e tratamento de diversas doenças. As substâncias responsáveis pela funcionalidade da soja são as IF, que são compostos químicos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrógenos e que estão amplamente distribuídos no reino vegetal. As concentrações destes compostos são relativamente maiores em leguminosas e as principais IF encontradas na soja e seus derivados são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína, que são as formas biologicamente ativas. De acordo com Setchell e colaboradores, a biodisponibilidade da genisteína, em humanos, é maior do que a da daidzeína ^{18, 19}.

As principais fórmulas bioquímicas destes compostos estão representadas na figura um:

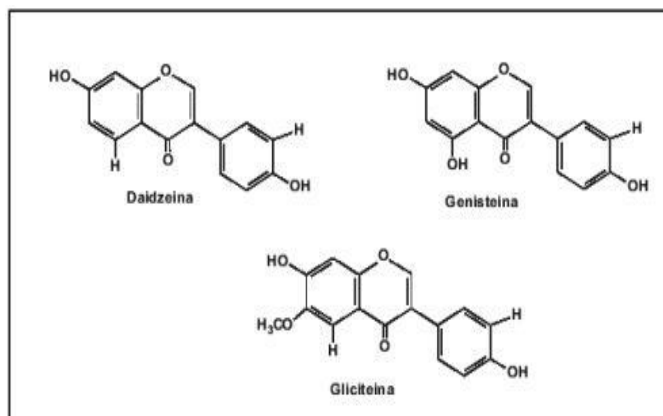


Figura 1 - Estrutura química das principais IF de soja ²⁰

As concentrações de IF na soja são determinadas geneticamente e são afetadas por fatores ambientais e pela temperatura do local. Dependendo da região onde é plantada e da temperatura média, a soja tem, aproximadamente, 147 a 180 mg de IF por 100g do produto, sendo que, à medida que a

temperatura da região do plantio aumenta, menor é a concentração da IF encontrada no grão ²¹.

Existe uma variabilidade considerável na eficiência digestiva das IF. Elas estão presentes nos alimentos ligados a açúcares e beta-glicosídeos. Nesta forma não são absorvidas pelo organismo humano. Somente as IF livres, sem a molécula de açúcar, as chamadas agliconas, ou seus produtos metabólicos, são absorvidos pela barreira epitelial do intestino. Enzimas hidrolíticas de bactérias intestinais são responsáveis por estas reações. No lúmen, as bactérias convertem grande parte dessas agliconas em outras moléculas. Esta absorção ocorre passivamente via micelas. Após a absorção, estas moléculas são incorporadas nos quilomícrons, que as transportam ao sistema linfático antes de entrar no sistema circulatório. Os quilomícrons distribuem as IF em todos os tecidos extra-hepáticos, onde irão exercer seus efeitos metabólicos, antes de devolvê-las ao fígado como quilomícrons remanescentes.

A retomada das IF circulantes do sangue ocorre passivamente e todas as células que contêm receptores para estrógenos, potencialmente, podem ser influenciadas por estas moléculas. Quando estas moléculas são secretadas na bile pelo fígado, aproximadamente quatro horas após a sua ingestão, parte é reabsorvida pela circulação entero-hepática e parte é excretada pelas fezes. A eliminação urinária é maior e corresponde a, aproximadamente, 10 - 30% da ingestão dietética ^{22,23}.

Os efeitos das IF variam de tecido para tecido e estas apresentam afinidade por receptores específicos. Tais efeitos ainda não estão suficientemente elucidados em nível molecular. Entretanto, estudos têm demonstrado que as IF possuem mecanismos gerais de ação que podem interferir no metabolismo de muitos nutrientes ^{22, 24}.

A soja também está associada à função estrogênica substituindo o hormônio feminino pós-menopausa. Mesmo sendo cerca de cem vezes mais fraco que o hormônio do ser humano, uma alimentação rica em soja e, conseqüentemente rica em IF, poderia minimizar os efeitos da diminuição dos hormônios, bem como proteger contra a destruição dos hormônios remanescentes ²⁵.

Em contrapartida, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), em documento publicado em 2002, conclui que não há

evidências convincentes de que os fitoestrogênios ou alimentação rica em soja possam ter efeitos significativos na terapia hormonal pós-menopausa ²⁶.

Muitos estudos clínicos sugerem que as IF não são efetivas, ou têm efeito pouco significativo na redução da sintomatologia da menopausa. Outros demonstram que esta efetividade está presente. Esta situação ocorre porque, aproximadamente 50% das mulheres que ingerem IF não têm a capacidade de transformá-las em equol, que é um estrogênio não esteróide, um modulador seletivo dos receptores de estrogênio, formado em nível intestinal e principal metabólito da daidzeína. As mulheres que possuem uma flora intestinal apta a tal conversão, geralmente apresentam benefícios relacionados à sintomatologia da menopausa, na prevenção de osteoporose e diminuição do risco cardiovascular ²⁷.

Jackman e colaboradores também pesquisaram a daidzeína e deram especial atenção ao equol. O equol tem uma meia vida longa e poder maior como antioxidante e concluíram que ele pode estar relacionado a um maior poder de vasodilatação, efeitos nos níveis de óxido-nítrico sintetase (NOS), atividade antioxidante e sugerem o poder de prevenir a hipertensão e acidente vascular encefálico (AVE) ²⁸.

Em relação ao câncer, muitos estudos sugerem que altas doses de IF podem levar ao desenvolvimento de neoplasias, outros defendem seu poder anticancerígeno. Um possível mecanismo de ação geral das IF inclui efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos, o que pode colaborar para o desenvolvimento de câncer, regulação da atividade de proteínas (especialmente das tirosina-quinases), regulação do ciclo celular e efeitos antioxidantes ^{22, 24}.

Lamartiniere e colaboradores sugerem que altas doses de daidzeína administrada via dieta não causam toxicidade significativa para o sistema reprodutivo de ratas fêmeas e nem provam um efeito protetor contra câncer mamário quimicamente induzido ²⁹.

A genisteína e o resveratrol, em associação ou usadas isoladamente, suprimem o desenvolvimento de câncer de próstata em ratos através da regulação de SRC-3 (receptor de esteróides coativador - 3) e fator de crescimento, sinalizando proteínas, são consistentes com estes polifenóis, reduzindo proliferação de células e apoptose na próstata ³⁰.

Em contrapartida, Messina e colaboradores sugerem que as IF podem inibir a angiogênese, topoisomerase II e tirosina quinases, o que pode ser prejudicial ao indivíduo. O potencial para estas atividades das IF para provocar citotoxicidade tem sido demonstrada pelos inibidores da topoisomerase II. A inibição das enzimas do DNA topoisomerase, que funcionam na clivagem de DNA e na religação durante a replicação de DNA pela genisteína, tem sido a causa do rompimento da fita de DNA. Evidências indicam que as IF não somente são clastogênicas como induzem mutações genéticas. A genisteína pode intensificar quimicamente a indução de tumores de cólon e das glândulas mamárias ³¹.

Manjanatha e colaboradores demonstraram, em estudo realizado com ratas fêmeas transgênicas sem ovários para modelo de menopausa, que a administração de daidzeína e genisteína isoladamente não afetou, significativamente, a quantidade de 7,12 - dimetilbenzo (alfa) antraceno (DMBA), utilizado para induzir a mutagênese e carcinogênese nas glândulas mamárias. Em contrapartida, a associação de daidzeína com a genisteína provocou efeito protetor, diminuindo a quantidade de DMBA ³².

Estudos realizados por Martins e colaboradores sugerem que a proteína de soja, comparada à proteína de origem animal, altera menos o ritmo de filtração glomerular em indivíduos saudáveis, esperando-se que pacientes com insuficiência renal crônica possam beneficiar-se com o uso da proteína de soja para melhorar o prognóstico para esta doença, aumentando o tempo de sobrevida e retardando o início de hemodiálise, melhorando, assim, a qualidade de vida destes indivíduos ³³.

A soja também pode influenciar na recuperação de queimados. Em pesquisa realizada com pacientes queimados que receberam o tratamento tradicional mais alimentação enteral baseada em soja, as células imunocompetentes foram estimuladas, principalmente linfócitos T, que participam dos processos de reparação, produção de anticorpos, síntese de citocinas antiinflamatórias, contribuindo para a regeneração da superfície queimada e acelerando a recuperação dos pacientes ³⁴.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece que as IF possuem efeito comprovado em relação às ondas de calor associadas à menopausa e como auxiliar na redução de colesterol, mas não reconhece as

alegações relacionadas ao câncer, osteoporose, reposição hormonal e proteção contra doenças cardiovasculares. Dado o perfil de uso e indicações terapêuticas, para a ANVISA, a IF é considerada medicamento e não um suplemento e deve possuir registro, não sendo enquadrada na legislação brasileira ³⁵.

Pesquisadores sugerem que, num futuro próximo, poder-se-ia utilizar biomateriais biodegradáveis, como alternativa na medicina regenerativa. Para os cirurgiões, o produto perfeito combinaria controle da reação inflamatória, não toxicidade e estimulação para a regeneração tecidual. Um produto baseado em soja poderia ser apresentado na forma de hidrogel, com aplicações clínicas específicas, já que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram a efetividade da soja em nível de componentes celulares, reações bioquímicas e potencial de regeneração ³⁶.

Em estudo realizado por Gleason e colaboradores, com indivíduos idosos tratados com IF, constataram incremento na construção visual e teste de memória, fluência verbal e melhora no padrão de desorientação, na função de planejamento de tarefas e memória verbal. Em suma, houve aumento nas habilidades cognitivas caracterizadas pelas funções do lobo frontal ³⁷.

Em uma meta-análise realizada com 730 indivíduos, Anderson e colaboradores mostraram que um consumo diário de 47 gramas de proteína de soja resultou em uma significativa diminuição no colesterol total, LDL colesterol e triglicerídeos, além de aumentar os níveis séricos de HDL colesterol. As IF neutralizam ou tornam mais lenta a taxa de oxidação da LDL-colesterol ³⁸.

Hagen e colaboradores pesquisaram o efeito da proteína isolada de soja em ratos machos Wistar, pós - infarto induzido, contra uma dieta de caseína usada como controle. Os ratos foram divididos em 8 grupos, considerando diferentes tamanhos de infarto. O infarto foi realizado na quinta semana e, um mês mais tarde, os ratos foram hemodinamicamente acessados para avaliação da pressão sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo e para avaliar capacidade de relaxamento e contratilidade. Fígado e baço foram avaliados para determinar o grau de congestão destes órgãos. O estresse oxidativo também foi avaliado e, após as análises, nos ratos que ingeriram a dieta à base de proteína isolada de soja, houve menos estresse oxidativo no músculo

cardíaco e um aumento da função ventricular sistólica e diastólica para ambos os grupos com diferentes tamanhos de infarto ³⁹.

Com relação aos mecanismos que tenham levado à melhora do grupo tratado com IF no estudo proposto por Ma e colaboradores, identificou-se uma degeneração de miofilamentos e a formação de linhas Z foram revertidas, o efeito negativo da droga sobre as mitocôndrias foi minimizado e houve a prevenção dos efeitos da redução do diâmetro do miócito e diminuição da miofibrilação ⁹. Isto pode ter ocorrido pelo metabolismo da L-arginina, que desempenha papel chave na fisiopatologia do sistema cardiovascular, especialmente através dos processos dependentes do óxido nítrico (NO) ^{40,41,42,43}

A inibição da arginase I miocítica de felinos com cloreto de boronoetil (BEC) revelou que a ação inotrópica negativa resultante dessa inibição está associada com o aumento de cGMP (guanosina monofosfato cíclica). Neste caso, a inibição da arginase estaria contribuindo para manter níveis elevados de L-arginina, que é essencial para a síntese de óxido nítrico (NO) nos miócitos e para sinalização NO/cGMP ⁴⁴.

O efeito cardioprotetor decorrente da inibição da atividade arginínolítica na doença isquêmica foi estudada por Jung e colaboradores, constatando-se que a inibição da arginase protege contra o infarto do miocárdio e sugerindo a arginase como uma enzima promissora para estudos terapêuticos de proteção contra o infarto do miocárdio ⁴⁵.

O efeito protetor de diversos compostos na cardiotoxicidade induzida por isoproterenol e análogos tem sido objeto de diversos estudos. Ganesan e colaboradores estudaram o efeito protetor da betaína sobre o estado energético mitocondrial e defesa antioxidante de ratos. Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK) no plasma, bem como as enzimas mitocondriais como a alfa-cetoglutarato desidrogenase (α -KG), isocitrato desidrogenase (ICDH), succinato desidrogenase (SDH), malato desidrogenase (MDH) e NADH desidrogenase foram utilizadas como marcadores do efeito protetor do tratamento prévio com betaína ⁴⁶.

O tratamento prévio de ratos com crocin, um carotenóide extraído do açafrão, durante 21 dias antes de induzir cardiotoxicidade com isoproterenol, sugere que esse carotenóide pode exercer efeito protetor anticardiotóxico.

Neste caso, a atividade miocárdica das enzimas creatina quinase – MB (CK-MB), LDH, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram utilizadas como biomarcadoras do processo ⁴⁷.

Em pesquisa realizada por Lin e colaboradores, em ratos infartados através da ligadura da artéria descendente anterior direita, após o infarto, três grupos foram estudados. Um grupo com concentração de 1 mg/Kg/dia e outro grupo com 0,1 mg/Kg/dia de resveratrol, além do grupo controle. Os animais receberam o resveratrol através de injeção peritonial, uma vez ao dia por quatro semanas. Nas análises ecocardiográficas, houve importante redução do infarto, além de aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e uma melhora da dilatação ventricular esquerda e redução da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Nas análises histológicas e hemodinâmicas, resultados positivos também foram encontrados, demonstrando que o resveratrol é um importante cardioprotetor ¹⁰.

Neste contexto, os tratamentos atuais propostos para o IAM tratam apenas as conseqüências do mesmo, não tendo benefício na causa básica, que é a perda do cardiomiócito. Por ser este um problema de saúde coletiva preocupante e que acomete, cada vez mais, um número maior de pessoas a nível mundial, novas opções terapêuticas são pesquisadas e utilizadas com o intuito de se encontrar uma prevenção efetiva para o IAM e para as doenças cardiovasculares e, uma vez que elas estão instaladas, melhorar as condições de vida destes pacientes. Desta forma, o objetivo destes tratamentos é proporcionar ao indivíduo uma melhor qualidade de vida para que ele possa recuperar-se e viver, o mais próximo possível, dentro do padrão de vida que possuía anteriormente.

5 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi apresentado ao CEUA (Comitê de Ética em Pesquisa no Uso com Animais) da PUCPR e aprovado sob número 201, em 02/04/2007.

Todos os animais receberam cuidados em concordância com princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ⁴⁸.

5.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Esta pesquisa foi experimental, com um total inicial de 90 ratos (*Rattus norvegicus*) da classe Wistar, com idade de quatro meses (adultos jovens), machos. Ao final do protocolo 41 animais foram incluídos no estudo com peso médio de $330,5 \pm 28,9$ g. Os animais foram randomizados para a distribuição entre os grupos.

O n da pesquisa foi elevado, pois a mortalidade operatória deste modelo de animal é de, aproximadamente, 40% ⁴⁹.

5.2 INDUÇÃO DO INFARTO

Todos os animais que foram submetidos ao infarto receberam anestesia geral com a administração de 50 mg/kg de peso de ketamina (Ketalar[®] Laboratórios Parke & Davis) e 10 mg/kg de peso xylazina (Xylazina[®]), aplicados por via intramuscular. Para certificação do efeito da anestesia, foi observada a ausência de reflexos neuro-musculares através de manobras com a cauda do animal e/ou estimulação nas patas. Os animais receberam paracetamol (1gt/Kg de peso) diluído em água para analgesia no pós-operatório.

Após anestesia, o animal foi submetido à intubação orotraqueal com cateter venoso periférico número 14 e ventilação mecânica com volume de 2,5 ml por insuflação, na frequência de 68 ciclos por minuto, observando-se a expansão torácica.

Foram utilizados respiradores de volume (*HARVARD®*, Inc., respirador modelo 683, *Massachusetts, USA*) para animais de pequeno porte com oxigênio a 21% (ar ambiente).

O infarto do miocárdio foi realizado pela ligadura cirúrgica da artéria coronária esquerda. A abertura do tórax foi realizada no quarto espaço intercostal esquerdo com exposição do coração. Em seguida, foi aberto o pericárdio. Com leve pressão lateral no tórax, realizou-se a exteriorização do coração. A ligadura da artéria coronária esquerda foi realizada a, aproximadamente, 2 mm do apêndice atrial esquerdo, com ponto único de fio monofilamentar 7.0. A eficiência do processo foi observada pela mudança da cor do coração, devido à área de isquemia provocada pelo infarto.

As intervenções cirúrgicas foram realizadas no Laboratório de Técnica Operatória da PUCPR e executadas por cirurgião cardiovascular, auxiliados por um técnico de laboratório. Os procedimentos foram realizados em condições de assepsia e com materiais adequados para animais de pequeno porte.

5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após cinco dias do IAM os animais foram submetidos à análise ecocardiográfica e os animais que apresentavam FE inferior a 45% foram incluídos no estudo, randomizados e divididos em três grupos:

- Controle – C (n=14).
- Isoflavona - IF (n=12).
- Extrato de Soja - ES (n=15).

Imediatamente após este procedimento, os animais começaram a receber os alimentos funcionais, que foi através de gavagem, realizada através de uma sonda nasogástrica curta, de PVC siliconizado nº 08, introduzida na cavidade oral do animal até atingir o estômago, por onde, as dietas modificadas

para os grupos estudados e água para o grupo controle foram administradas ⁵⁰,
51.

Os animais do grupo controle receberam 2 ml de água mineral em temperatura ambiente, durante 25 dias, sete dias por semana. As doses foram administradas duas vezes ao dia. As dosagens foram aferidas através de seringa de 5 ml. A sonda nasogástrica curta tem 1 ml de capacidade e, antes de administrar o produto, ela foi preenchida para evitar a administração de ar no estômago do animal. O conteúdo foi administrado lentamente para evitar desconforto e regurgitação.

Os animais do grupo IF, da marca Novasoy 152-400 em concentração de 40% (sendo Genisteína, Daidzeína, Gliciteína: 1,3 : 1,0 : 0,3), lote 0507111. A ADM do Brasil Ltda forneceu a IF necessária para a pesquisa. Eles receberam 2 ml da IF diluída em água mineral em temperatura ambiente e, em se tratando de uma suspensão, a mistura foi mantida em constante agitação através do agitador magnético da Marca Fisatom, modelo 752, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da PUCPR. A IF foi oferecida, também, duas vezes ao dia, sete dias por semana, durante 25 dias, através do mesmo processo e tempo descritos para o grupo controle. A quantidade oferecida para cada animal foi de 120 mg/Kg/dia. As dosagens foram ajustadas no meio do período, devido à variação de peso dos ratos, visando à adequação prevista na literatura científica para a concentração de IF, que é de 120 mg/Kg de peso do animal ⁹.

Os animais do grupo ES receberam o alimento funcional, diluído em água mineral a temperatura ambiente, duas vezes por dia, sete dias na semana, no período de 25 dias, através dos mesmos procedimentos descritos anteriormente. A quantidade administrada de ES foi de 12,52 g/rato/dia. Os cálculos desta quantidade a ser administrada foram realizados para que os animais recebessem a mesma concentração de IF que o grupo IF recebeu.

O ES, fornecido pela Olivebra, foi escolhido como principal fonte de proteína de soja e IF, por ser este um produto facilmente encontrado para comercialização, portanto, de fácil acesso para a comunidade e, por ser previamente processado, os efeitos indesejáveis dos fitatos na absorção de nutrientes foi minimizado e, as chances de comprometimento do estado nutricional, também minimizadas.

A dosagem e determinação do tipo de IF contidas no ES foram realizadas pela EMBRAPA de Londrina – PR e é demonstrada na Figura 2.

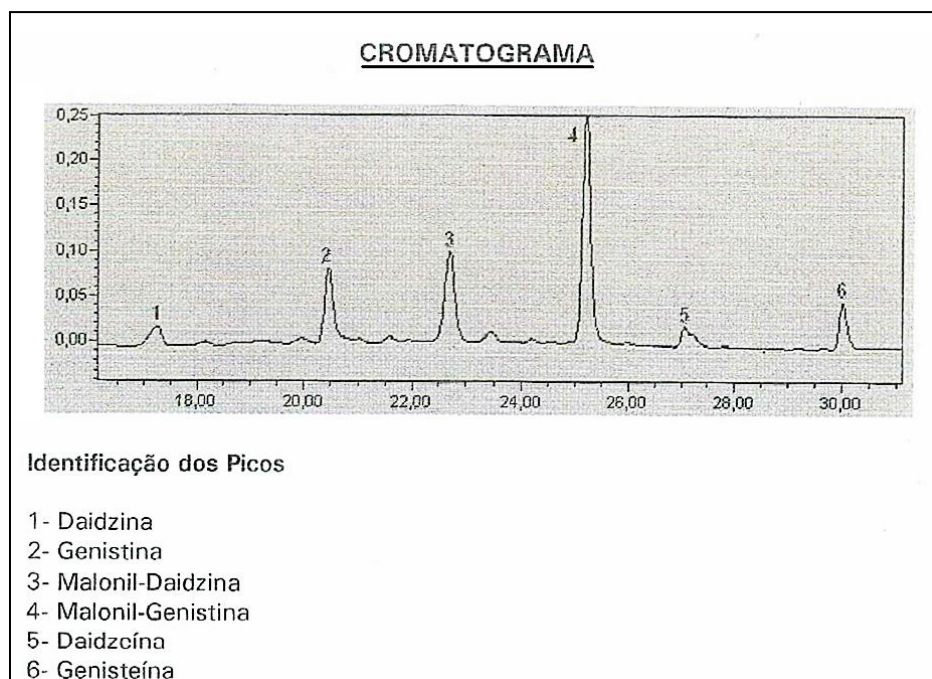


Figura 2 - Cromatograma com a expressão dos diferentes tipos de IF no ES

Todas as aferições, IF e ES, foram realizadas no Laboratório de Estomatologia da PUCPR, na balança de precisão BEL MARK U210A, com capacidade máxima de 210 g e precisão de 100 mg.

Todos os procedimentos foram realizados no biotério e no Laboratório de Técnica Operatória da PUCPR, que ofereceram condições para realização desta pesquisa, tanto em relação às acomodações, efetuadas em caixas de polipropileno, com dimensões de 414 mm por 344 mm e 168 mm de profundidade e forradas com cipilho de pinus, quanto em relação ao número de animais requerido para o estudo e técnicas aplicadas na metodologia. Cada caixa acomodou, no máximo, três animais.

O ciclo claro-escuro foi respeitado para que os animais pudessem ter um comportamento o mais próximo possível do normal e alimentar-se adequadamente. A temperatura da sala foi mantida entre 18° e 23°C e a umidade relativa do ar (URA) entre 45% a 65%.

5.4 ANÁLISE DO PESO

O peso dos animais foi aferido a cada sete dias, o que possibilitou o conhecimento da curva de ganho de peso, podendo-se, com estes dados, relacionar se os produtos utilizados afetaram, de maneiras diferentes, estas curvas, em relação ao grupo controle. As aferições foram realizadas no biotério, na balança digital Filizola, modelo BP6, com sensibilidade de 2 g.

5.5 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA

A ecocardiografia foi realizada para a determinação da capacidade da função cardíaca pré e pós-infarto, com ou sem o tratamento com a soja e para avaliação da extensão do IAM. Os animais, após o IAM induzido, que apresentaram frações de ejeção acima de 45%, foram excluídos do experimento.

Para o exame ecocardiográfico, os animais foram anestesiados seguindo o mesmo procedimento para o IAM e, posteriormente, submetidos à tricotomia na região anterior do tórax. Foram conectados eletrodos nas patas para obtenção do traçado eletrocardiográfico e, em seguida, posicionado o animal em leve decúbito lateral esquerdo. Foram analisados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC, bpm), volume sistólico final (VSF, ml), volume diastólico final (VDF, ml) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE,%).

Foi utilizado ecocardiógrafo *Agilent* (modelo Sonos 5500; *Andover, MA*), equipado com transdutores de alta frequência e alta resolução (12 MHz e 15 MHz, modelo 21390^A, *Agilent, Palo Alto, CA*). O equipamento possui capacidade de 120 (Hertz) quadros por segundo. Para obtenção do traçado Doppler, foi utilizado velocidade de 100 mm/s.

O estudo ecocardiográfico foi realizado com cinco e 30 dias após o infarto do miocárdio. As medidas foram realizadas durante o exame, obedecendo às recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

As imagens foram gravadas em disco óptico e em fita VHS. Foram realizadas as medidas em três ciclos cardíacos consecutivos, pelo mesmo examinador, de forma cega, e calculada a média para análise ⁵².

Foram obtidas imagens no corte para-esternal longitudinal, onde se visualizou o átrio esquerdo, a valva mitral, o ventrículo esquerdo, a valva aórtica e parte da aorta ascendente. Nesta posição, foi realizada a planimetria do ventrículo esquerdo pelo método de Simpson, para obtenção dos volumes diastólico e sistólico finais e cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

A medida do volume diastólico final do ventrículo esquerdo foi realizada no pico a onda "R" do eletrocardiograma, enquanto que o volume sistólico final foi obtido identificando-se a menor área da câmara cardíaca.

5.6 CONTROLE DA INGESTÃO DE RAÇÃO

Além das dietas a base de extrato de soja e isoflavona, todos os animais foram alimentados, sob livre demanda, com ração tradicional Nuvilab CR1, da marca Nuvital, registrada no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária sob número PR58033-00103 e água. A ingestão de ração foi controlada a cada três dias para todos os grupos trabalhados, aferindo-se a quantidade de ração oferecida e a que restou na caixa, calculando-se uma média de ração ingerida por caixa e para cada rato.

Cada animal adulto ingere, em média, segundo dados de Sliva, 25-30 g de ração por dia. Uma vez que a ração possui 2900 Kcal / 1000 g de energia metabolizável, cada rato deve consumir 72,5 - 87 Kcal/dia, uma média de 80 Kcal/dia ⁵³.

5.7 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados segundo metodologia descrita pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, após a realização da segunda ecocardiografia, que correspondeu a trinta dias pós-infarto. A eutanásia dos

ratos foi efetuada, aproximadamente, 24 horas após a última administração das dietas, por meio da injeção intraperitoneal de Thiopentax, tiopental sódico, 0,5 g para cada animal(pó estéril de uso intravenoso) ⁵⁴ .

5.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após a eutanásia dos animais, os corações foram seccionados transversalmente em três partes, sendo que, duas delas foram conservadas em formalina, para a análise patológica, e a outra foi congelada em nitrogênio líquido, para análise bioquímica. A musculatura cardíaca dos ratos foi homogeneizada em *Potter/Elvehjem*, na proporção de 1g de tecido para 5 mL de solução tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) e sonicada durante 30 segundos. Após centrifugação a 14.000g durante 10 minutos, o sobrenadante do homogeneizado foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas e proteínas totais. Todas as etapas de preparação dos homogeneizados foram conduzidas em temperaturas entre zero e 4°C.

As atividades das enzimas Malato desidrogenase (MDH: E.C. 1.1.1.37), Lactato desidrogenase (LDH: E.C. 1.1.1.27) foram determinadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo: a) MgCl₂ 20 mM, oxaloacetato 0,4 mM e NADH+H⁺ 150 mM para a MDH e b) piruvato de sódio 1 mM, KCl 100 mM e NADH+H⁺ 150 μM para LDH ^{55, 56}. Em ambos os casos, as atividades enzimáticas foram determinadas acompanhando a redução da absorbância do sistema de reação em comprimento de onda de 340nm.

A atividade da arginase (ARG: E.C. 3.5.3.1) foi determinada pelo método de Iyamu modificado ⁵⁷ . O sistema de reação foi composto de tampão glicina 50 mM (pH 9,5), contendo L-arginina 100 mM e MnCl₂ 1 mM. A reação teve o seu início pela adição de 20 μL de homogeneizado a 230 μL do sistema de reação. O sistema permaneceu incubado a 37°C durante 2h e a reação foi interrompida pela adição de 250 μL de ácido clorídrico 0,75 M. Após centrifugação a 14.000 x g, durante 10 minutos, alíquotas de 50 μL de sobrenadantes foram transferidas para microtubos contendo reativo cromogênico (50 μL de água e 200 μL de ninhydrin 6% (p/v) dissolvida em 2-

metoxietanol), aquecidas durante 25 minutos a 100°C, arrefecidas, transferidas para microplacas de 96 poços e lidas em comprimento de onda de 505nm.

As leituras espectrofotométricas das microplacas foram realizadas no espectrofluorômetro Fluostar, fabricado pela BMG. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidade Internacional (U), definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μ mol de substrato em produto, no tempo de 1 minuto a 37°C.

A proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando soro albumina bovina como padrão ⁵⁸. O conteúdo protéico das amostras foi utilizado para calcular a atividade específica das enzimas, que foram expressas em mU/mg de proteína (miliunidade internacional/mg de proteína).

5.9 HISTOPATOLOGIA

Foram retirados os corações de todos os animais para avaliação morfológica no Laboratório de Anatomia Patológica da PUCPR. O método utilizado para análise anátomo-patológica foi o *Sirius red*, que promove coloração em vermelho do colágeno, fibras reticulares, cartilagens e membranas basais, avaliando a proliferação do colágeno (quantidade e tipo) e os diferenciando entre colágeno imaturo e maduro ⁵⁹.

Os corações dos ratos foram cortados longitudinalmente e, posteriormente, fixados em solução de formaldeído a 10%. Após este procedimento, foram embebidos em parafina, cortados com espessuras de 4 μ m e corados com *picro-Sirius red*, para análise histomorfométrica. Para isto, foi utilizada a microscopia óptica, objetiva com aumento de 200 vezes, microscópio binocular marca Olympus® modelo BX50, acoplado a um computador marca DELL®, onde se encontra instalado o *software* Image Pro Plus® para realização da análise. A partir da digitalização da imagem do campo pelo *software*, tendo como referência uma cor padronizada pelo observador, calcula-se a área da amostra, que apresenta uma cor referente. As imagens foram realizadas em triplicata ⁵⁹.

Com relação à análise do colágeno para cada lâmina, em cada uma das localizações analisadas (local 0, região do infarto do miocárdio, local 1, região

de transição do infarto e do miocárdio íntegro e local 2, parede livre do ventrículo esquerdo), e em cada campo (1, 2 e 3) foi calculada a área total de colágeno maduro e a área total de colágeno imaturo considerando-se todas as leituras efetuadas. Os valores das áreas de colágeno maduro e colágeno imaturo da lâmina, considerados para a análise comparativa dos grupos, foi a média das áreas dos três campos. A partir destes resultados, foram calculados os percentuais de colágeno maduro e imaturo, em relação à soma das áreas de colágeno maduro e imaturo, além do colágeno total (imaturo e maduro) para os três grupos. Sendo assim, a soma destes percentuais é igual a 100%.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar os momentos pré e pós dentro de cada grupo em relação a variáveis quantitativas, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. Para a comparação dos grupos em relação aos resultados da avaliação pré, foi usado o modelo de análise de variância (ANOVA) com um fator. Para a comparação dos grupos em relação aos resultados da avaliação pós e em relação às diferenças entre pré e pós, foi usada a análise de covariância, considerando-se a medida pré como covariável. Variáveis com distribuições assimétricas foram analisadas considerando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A condição de simetria das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o uso do programa computacional Statistica v.8.0⁶⁰.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DO PESO

A análise intra-grupo no período entre o IAM e trinta dias após revelou que, com relação ao peso, pôde-se verificar um aumento nos três grupos estudados, conforme figura três. Os valores expressos são, 327,78g para 399,33g, com $p < 0,001$, 321,16g para 350,87g, com $p = 0,001$ e 342,96g para 379,49g, com $p < 0,001$ para os grupos IF, ES e C, respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa na avaliação do peso pré ao comparar-se os três grupos ($p = 0,116$). Contudo, foi encontrada diferença significativa entre os três grupos na avaliação pós ($p < 0,001$).

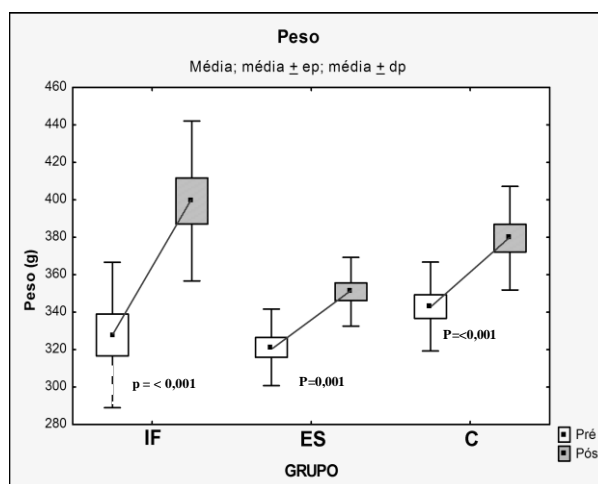


Figura 3 - Análise comparativa do peso para os três grupos

Na tabela um, quando se comparam os grupos entre si, após trinta dias, identificou-se uma diferença significativa entre os grupos comparados dois a dois.

Tabela 1 - Valores de p para a expressão do peso encontrado nos três grupos

Grupos comparados	Valor de p
ES x C	0,007
ES x IF	< 0,001
C x IF	0,030

6.2 INGESTÃO DA RAÇÃO

Na tabela dois expressa-se a quantidade de ração ingerida pelos grupos durante o experimento.

Tabela 2 - Quantidade de ração ingerida nos três grupos

Grupo	Consumo de ração (g/rato/dia)
IF	28,0
ES	17,0
C	30,0

O grupo IF teve uma ingestão calórica, proveniente da ração, de 81,2 Kcal/rato/dia. O grupo ES ingeriu 49,3 Kcal/rato/dia e o grupo controle ingeriu 87,0 Kcal/rato/dia.

6.3 MORTALIDADE

Na tabela três, expressa-se o número e percentual de óbitos em relação ao tamanho do n inicial, de 30 animais para cada grupo.

Tabela 3 - Mortalidade durante o experimento

GRUPOS	INÍCIO PROC. Nº DE RATOS	PÓS IAM	ECO	INÍCIO BIOTÉRIO	FINAL BIOTÉRIO	MORTAL TOTAL	%
IF (n=12)	30	15	0	0	3	18	60
C (n=14)	30	8	0	0	8	16	54
ES (n=15)	30	11	2*	0	2**	15	50

* 02 ratos excluídos porque estavam com a fração de ejeção acima de 45%.

** 02 ratos eutanasiados por aparecimento de feridas pelo *stress*.

6.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS

As atividades argininolíticas médias dos grupos IF, ES e C estão apresentadas na figura quatro. As atividades médias da arginase nos grupos IF e ES foram menores do que a do grupo C, embora não significativas.

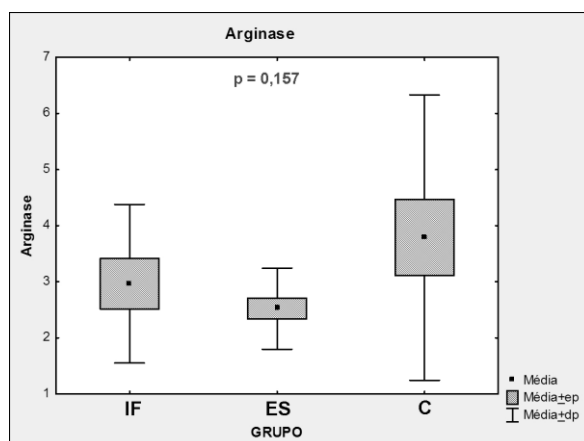


Figura 4 - Expressão da atividade da Arginase para os três grupos

As diferenças entre os valores médios da atividade da LDH no tecido cardíaco de ratos dos grupos IF, ES e C estão representadas na figura 5. A atividade específica da LDH no grupo tratado com ES foi mais expressiva com diferença significativa.

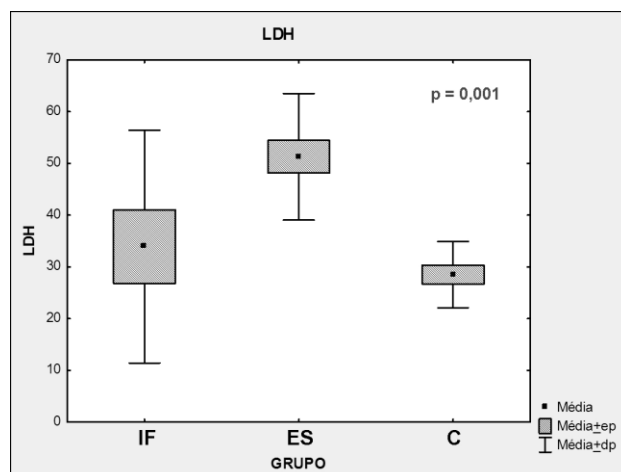


Figura 5 - Expressão da atividade de LDH para os três grupos

Para a variável atividade da LDH, houve diferença significativa nos 2 grupos comparados C x ES e IF x ES. Sendo assim, os grupos foram comparados dois a dois e os valores de p são apresentados na tabela quatro.

Tabela 4 - Valores de p para a expressão da atividade de LDH para os três grupos

Grupos comparados	Valor de p
C x IF	0,388
C x ES	<0,001
IF x ES	0,006

Na figura seis, são representadas as diferenças entre os valores médios da atividade de MDH do grupo C e a dos grupos tratados com IF e ES, que foram significativas.

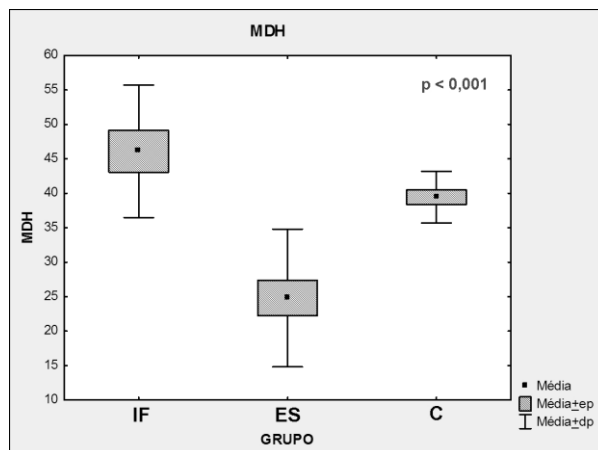


Figura 6 - Expressão da atividade da MDH para os três grupos

Para a variável MDH, houve diferença significativa nos 2 grupos comparados C x ES e IF x ES. Sendo assim, os grupos foram comparados dois a dois e os valores de p são apresentados na tabela cinco.

Tabela 5 - Valores de p para a expressão da atividade de MDH nos três grupos

Grupos comparados	Valor de p
C x IF	0,072
C x ES	<0,001
IF x ES	<0,001

6.5 HISTOPATOLOGIA

Nas figuras sete, oito e nove, a identificação de colágeno maduro e imaturo para os três grupos estudados.

Nota-se que, no grupo ES houve uma menor presença de colágeno maduro, em relação aos demais grupos.

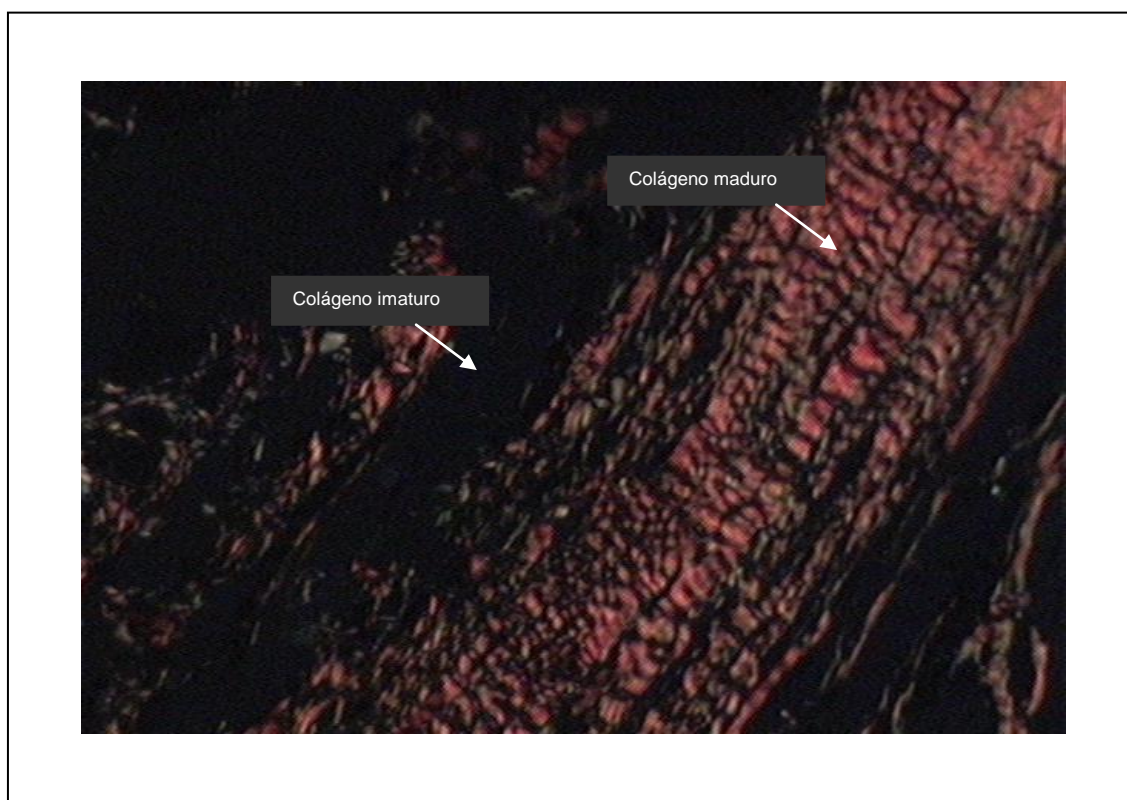


Figura 7 - Expressão de colágeno maduro e imaturo do grupo C. Rato n° 03 - região proximal ao IAM

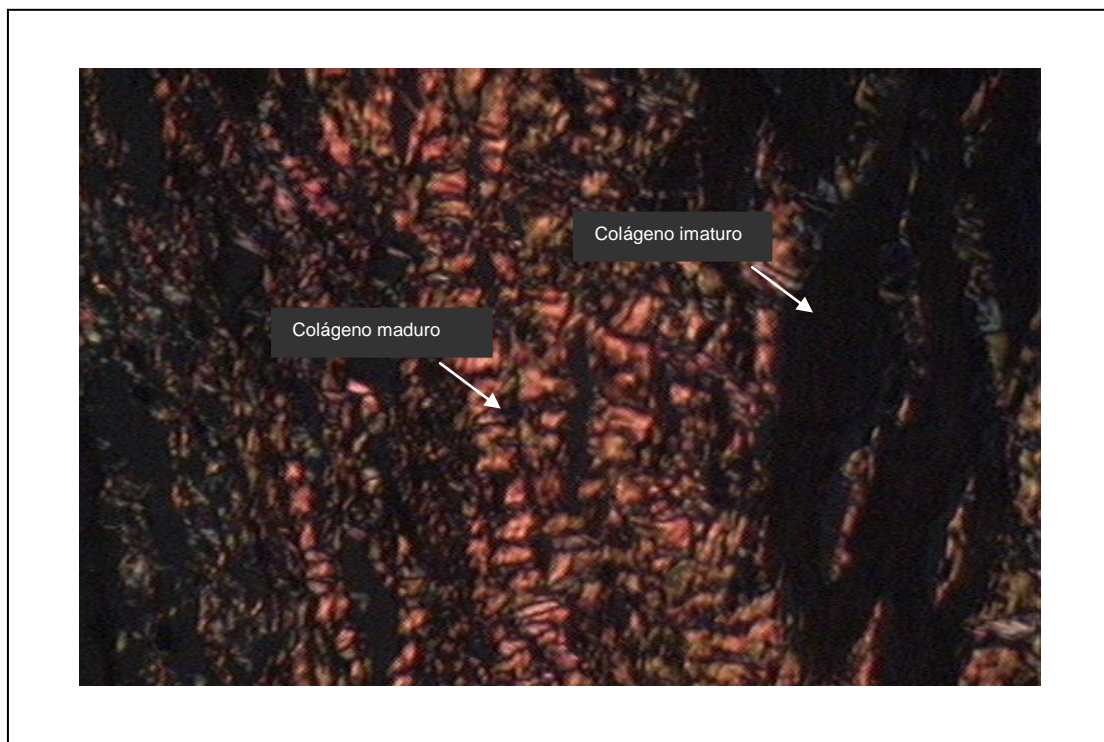


Figura 8 - Expressão de colágeno maduro e imaturo do grupo IF. Rato n° 07 - região proximal ao IAM

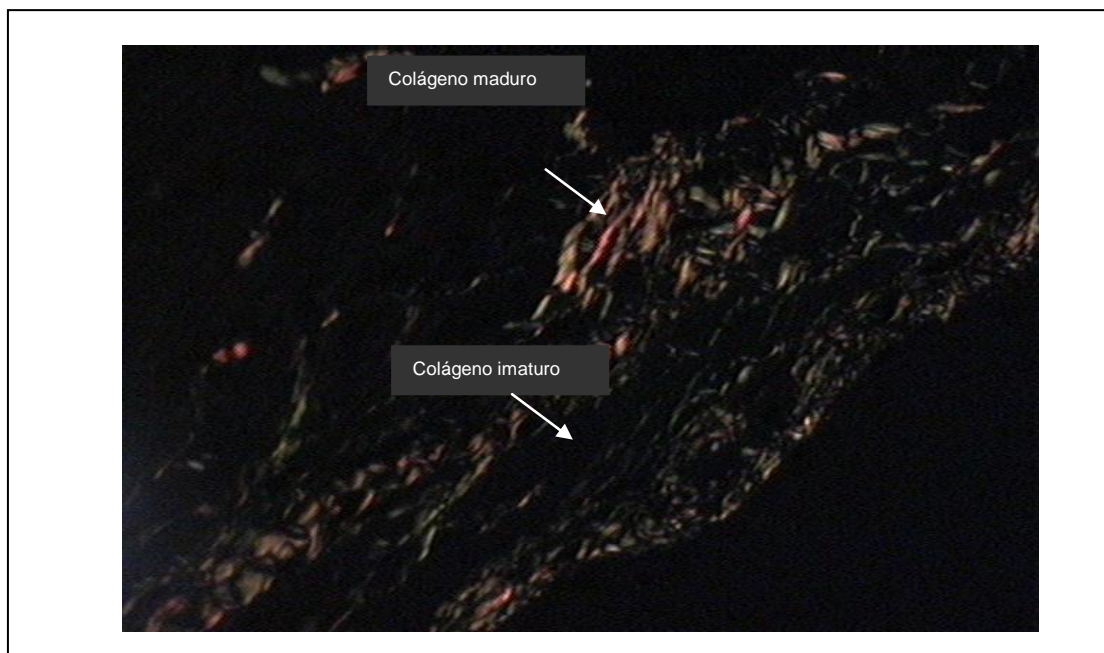


Figura 9 - Expressão de colágeno maduro e imaturo do grupo ES. Rato n° 13 - região proximal ao IAM

Ainda, em relação à análise do colágeno, os dados obtidos estão expressos na tabela seis, sendo que, o local 0 refere-se à região do infarto do miocárdio, o local 1 à região de transição entre o infarto e o miocárdio íntegro e o local 2 à parede livre do ventrículo esquerdo.

Tabela 6 - Análise dos dois tipos de colágeno e colágeno total para os três grupos

Local	Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p		
Local 0	Col mad - área	C	14	5496	5221	3481	8706	1650	0,925*		
		ES	9	5670	5742	1745	7462	1766			
		IF	9	5390	5164	4061	7044	969			
	Col imat - área	C	14	2806	2618	1554	4551	762		0,288*	
		ES	9	3077	2909	2192	4150	743			
		IF	9	3484	3096	2126	6326	1420			
	Col total - área	C	14	8301,8	8193,2	5391,9	10715	1758,7			0,740*
		ES	9	8747,6	8159,4	3959,0	11613	2368,8			
		IF	9	8873,9	8849,1	6187,1	10775	1390,4			
	Col mad %	C	14	65,52	66,68	49,41	81,26	8,64	0,600*		
		ES	9	63,61	64,66	44,08	72,37	8,11			
		IF	9	61,54	65,63	41,29	74,33	10,89			
Col imat %	C	14	34,48	33,32	18,74	50,59	8,64	0,600*			
	ES	9	36,39	35,34	27,63	55,92	8,11				
	IF	9	38,46	34,37	25,67	58,71	10,89				
Local 1	Col mad - área	C	14	3497	3650	1156	5901			1548	0,014*
		ES	9	1741	1574	580	2941			815	
		IF	9	2866	2932	922	4747			1292	
	Col imat - área	C	14	1941	1755	805	3756		856	0,209*	
		ES	9	1415	1243	356	2366		725		
		IF	9	2229	2408	493	4486		1293		
	Col total - área	C	14	5438,1	5424,6	2634,1	9407	1903,8	0,030*		
		ES	9	3156,0	3046,0	936,3	5281	1378,5			
		IF	9	5094,6	5417,9	1503,4	9232	2483,0			
	Col maduro %	C	14	63,03	68,13	25,85	80,49	14,61			0,341*
		ES	9	55,79	55,69	32,50	72,75	10,98			
		IF	9	57,86	56,28	49,00	67,51	7,44			
Col imaturo %	C	14	36,97	31,87	19,51	74,15	14,61	0,341*			
	ES	9	44,21	44,31	27,25	67,50	10,98				
	IF	9	42,14	43,72	32,49	51,00	7,44				
Local 2	Col mad - área	C	14	1484	1140	459	3425		1044	0,418**	
		ES	9	1246	676	470	5169		1510		
		IF	9	2309	2283	269	4802		1615		
	Col imat - área	C	14	940	759	241	2776		704		0,153**
		ES	9	620	516	233	1620		411		
		IF	9	1835	1629	67	5034		1637		
Col total - área	C	14	2423,8	2205,6	699,9	4390	1471,3	0,242**			
	ES	9	1865,1	1214,2	702,8	6789	1905,2				
	IF	9	4143,9	3912,5	335,7	9836	3218,2				

Col maduro %	C	14	59,99	62,49	35,24	80,32	13,78	0,921*
	ES	9	61,78	62,86	49,59	76,14	8,63	
	IF	9	59,78	57,48	48,81	79,98	11,03	
Col imaturo %	C	14	40,01	37,51	19,68	64,76	13,78	0,921*
	ES	9	38,22	37,14	23,86	50,41	8,63	
	IF	9	40,22	42,52	20,02	51,19	11,03	

* Análise de variância com um fator, $p < 0,05$

** Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Para a variável Colágeno maduro – área, do local 1, foi encontrada diferença significativa entre os 3 grupos. Sendo assim, os grupos foram comparados dois a dois e os valores de p são apresentados na tabela sete.

Tabela 7 - Valores de p para a expressão da quantidade de colágeno maduro encontrado nos três grupos

Grupos comparados	Valor de p
ES x C	0,004
ES x IF	0,269
C x IF	0,079

Para a variável Colágeno total no local 1, foi encontrada diferença significativa entre os três grupos. Sendo assim, os grupos foram comparados dois a dois e os valores de p são apresentados na tabela oito.

Tabela 8 - Valores de p para a expressão da quantidade de colágeno total encontrado nos três grupos

Grupos comparados	Valor de p
ES x C	0,011
ES x IF	0,685
C x IF	0,045

6.6 ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS

Nos gráficos a seguir são apresentadas estatísticas descritivas de cada variável, para cada grupo. Foram consideradas as avaliações pré e pós. Também são apresentados os valores de p dos testes estatísticos relativos à comparação da avaliação pré com a avaliação pós, ou seja, o efeito do tratamento dentro de cada grupo e entre os grupos.

Em relação à frequência cardíaca, os valores expressos, demonstrados no figura 10, foram 232,67bpm para 237,67bpm, com $p=0,624$, 269,31bpm para 219,85bpm, com $p=0,020$ e, 270,93bpm para 256,36bpm com $p=0,520$, na análise intra-grupo, para os grupos IF, ES e C, respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa na frequência cardíaca pré ao comparar-se os três grupos ($p=0,080$). Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos na avaliação pós ($p=0,071$).

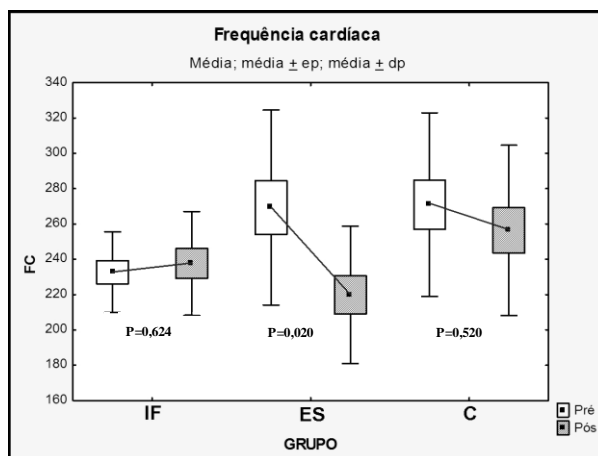


Figura 10 - Análise comparativa da frequência cardíaca para os três grupos

Com relação à fração de ejeção do ventrículo esquerdo, identificou-se, na figura onze, uma diminuição deste parâmetro nos três grupos estudados. Os valores expressos na análise intra-grupo foram 39,42% para 32,91%, com $p=0,017$, 36,77% para 34,17%, com $p=0,320$ e 40,38% para 38,33%, com $p=0,432$ para os grupos IF, ES e C, respectivamente. Não foi encontrada

diferença significativa na avaliação da fração de ejeção pré ao comparar-se os três grupos ($p=0,401$). Da mesma forma, não foi encontrada diferença entre os três grupos na avaliação pós ($p=0,382$).

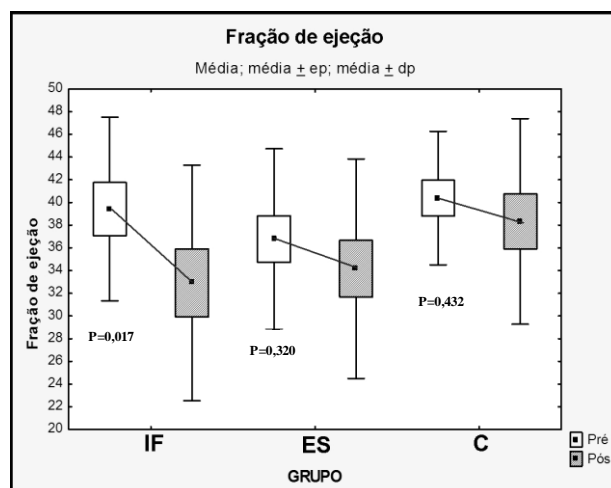


Figura 11 - Análise comparativa da fração de ejeção para os três grupos

Com relação ao volume sistólico final do ventrículo esquerdo na análise intra-grupo, demonstrada na figura doze, identificou-se um aumento desta variável nos três grupos. Os valores expressos foram 0,24ml para 0,45ml, com $p=0,001$, 0,36ml para 0,41ml, com $p=0,140$, 0,31ml para 0,43ml, com $p=0,009$ para os grupos IF, ES e C, respectivamente. Foi encontrada diferença significativa na avaliação do volume sistólico final pré ao comparar-se os três grupos entre si ($p=0,012$). Não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos na avaliação pós ($p=0,253$).

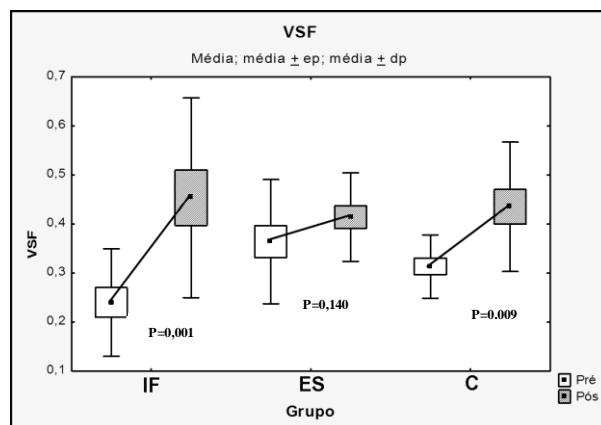


Figura 12 - Análise comparativa do volume sistólico final para os três grupos

Com relação ao volume diastólico final do ventrículo esquerdo na análise intra-grupos, identificou-se, conforme demonstra a figura treze, um acréscimo desta variável nos três grupos. Os valores expressos foram 0,44ml para 0,61ml, com $p=0,008$, 0,57ml para 0,63ml, com $p=0,205$ e 0,53ml para 0,67ml, com $p=0,014$ para os grupos IF, ES e C, respectivamente. Na comparação dos grupos em relação ao VDF pré, houve diferença significativa entre os grupos IF e ES ($p=0,048$). Na avaliação pós, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p=0,639$).

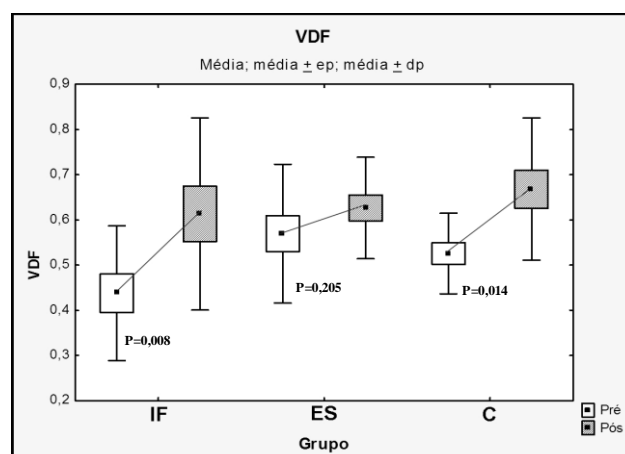


Figura 13 - Análise comparativa do volume diastólico final para os três grupos

7 DISCUSSÃO

O uso de ES foi sugerido pela *FDA* em 1999, que reconheceu que os constituintes da soja poderiam estar trazendo algum tipo de benefício cardioprotetor ¹⁷. Entretanto, a suplementação de IF em comprimidos ou mesmo em alimentos não foi recomendada pela *American Heart Association* em 2006 ⁶¹. Esta decisão talvez tenha sido motivada pela falta de conhecimento científico sobre ação das IF e constituintes da soja.

Os supostos efeitos protetores das IF e compostos fitoquímicos polifenólicos da soja nas doenças cardiovasculares têm sido objeto de diversos estudos ⁶². O efeito cardiovascular das IF, *in vitro* e *in vivo*, envolve a combinação da ativação de sistemas vasodilatadores e inibição de mecanismos constritores. Os mecanismos moleculares de ação das IF incluem vias sinalizadoras como ERKe/2, PI3-kinases/Akt e ativação da eNOS ⁶³. Os benefícios dessa classe de compostos no tratamento da osteoporose, menopausa e câncer de mama, também têm sido estudados ^{64,65,66}.

Os efeitos da soja sobre os mecanismos de redução de colesterol já foram descritos, entretanto, os efeitos terapêuticos no infarto do miocárdio não foram ainda estudados. Com relação aos efeitos da soja nas miocardiopatias, Ma e colaboradores sugeriram que estes alimentos funcionais apresentaram benefício. Os mecanismos que justificaram estes achados estão baseados no fato de que a IF manteve as miofibrilas organizadas, diminuindo o efeito tóxico da adriamicina em um modelo de miocardiopatia dilatada ⁹. Sugere-se que o efeito anti-inflamatório das IF tenha diminuído o efeito tóxico da adriamicina e, como consequência, foi identificada melhora da função cardíaca.

Contrariamente ao que demonstrou Ma e colaboradores, neste estudo identificou-se que o grupo IF diminuiu a FE, aumentou o VDF e VSF, assim como os animais do grupo controle, sugerindo alterações características de uma evolução tardia do infarto do miocárdio com insuficiência cardíaca. Estes dados sugerem que a IF isolada não apresentou benefício pós-infarto do miocárdio. É verdade que a fisiopatologia de base dos modelos de miocardiopatia dilatada induzida pela adriamicina e o infarto do miocárdio são diferentes. Porém, corroborando com Lin, o alimento funcional exerceu efeito cardioprotetor pós-infarto do miocárdio ¹⁰.

Um fator relevante é que a IF, quando separada da proteína de soja, parece perder parte de seu efeito funcional, principalmente em relação às doenças cardiovasculares, o que sugere ser indispensável a ingestão da mesma junto à leguminosa. Este efeito também foi observado em estudos com primatas e, o que é ainda mais relevante, se a IF for retirada da proteína de soja e, posteriormente restaurada à matriz protéica, este alimento perde parte do efeito funcional. Quando a proteína de soja está associada à IF, o perfil lipoprotéico diminui consideravelmente ^{67,68,69}. Percebe-se, através dos resultados destas pesquisas, que a IF deve ser ingerida como a natureza as criou, inserida no alimento, pois o ser humano está fisiologicamente programado para captar do alimento o componente que irá causar o efeito funcional, sendo que o mesmo estará mais biodisponível desta forma.

Neste estudo, em relação ao peso dos animais, houve pesos basais homogêneos e, apesar de os três grupos terem apresentado aumento deste parâmetro após o infarto do miocárdio, inclusive quando os grupos foram comparados dois a dois, com significância estatística, este efeito provavelmente ocorreu em consequência de duas situações: pelo próprio crescimento dos animais e, possivelmente, pelo aumento da retenção hídrica causada pela insuficiência cardíaca desenvolvida no grupo IF. O grupo que menos ingeriu ração foi o ES, talvez por ser o único grupo que recebeu valor calórico agregado via gavagem, porém, teve menor incremento de peso.

Em relação à ingestão de ração, os animais consumiram o que a literatura preconiza como habitual, sendo que, o consumo para o grupo isoflavona foi de 28g/rato/dia, para o grupo ES, 17 g/Kg/dia e, para o grupo controle, 30 g/Kg/dia. Os dados de Sliva indicam que a média do consumo de ração, por dia e por rato, é de 25-30 g, com uma ingestão calórica de 80 Kcal/dia ⁵³.

Uma forma de justificar os mecanismos de melhora funcional no grupo ES, neste estudo, foi analisando-se os marcadores bioquímicos. Identificou-se que a redução da atividade arginínolítica miocárdica, observada no grupo tratado com IF e com ES, podem ser decorrentes do efeito da IF e constituintes do ES sobre a expressão gênica da arginase no tecido cardíaco destes ratos e indicam que o provável fator cardioprotetor seja a IF. A discreta resposta

cardioprotetora da IF e do ES pode ter relação com a eficácia da suplementação alimentar pós-infarto. O efeito dos compostos cardioprotetores sobre a função cardiovascular ficaram evidentes. Estudos com flavonóides do cacau revelaram que essa classe de compostos tem capacidade de reduzir a atividade arginínolítica em eritrócitos e células endoteliais umbilicais humanas, regulando o metabolismo e disponibilizando L-arginina para síntese de NO, um potente vasodilatador e cardioprotetor, vislumbrando a possibilidade de intervenções terapêuticas dietéticas ⁷⁰. A redução da atividade arginínolítica no tecido cardíaco dos grupos IF e ES, embora não significativa, evidencia o potencial efeito cardioprotetor da IF e dos constituintes do ES, mediado pela regulação para baixo (*downregulation*) do catabolismo da L-arginina. Como as arginases e as óxido nítrico sintases (NOS) competem pelo mesmo substrato (L-arginina), a redução da atividade arginínolítica na musculatura cardíaca dos ratos infartados e tratados com IF e ES, preserva e disponibiliza a L-arginina para as NOS. A produção de óxido nítrico tem sido considerada de fundamental importância na regulação do tônus muscular, resistência periférica e perfusão do músculo cardíaco ⁷¹. Óxido nítrico e peptídeos natriuréticos modulam a atividade das enzimas guanilato ciclases e são considerados os principais reguladores autócrinos e parácrinos da função cardiovascular ⁷².

Três formas isoenzimáticas de NOS são expressas nos tecidos e denominadas de neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial (eNOS). As formas nNOS e eNOS estão presentes na musculatura cardíaca e são reguladas por processos transcricionais e pós-transcricionais. A atividade arginínolítica tem sido apontada como modulador pós-transcricional das NOS. A competição pelo mesmo substrato e a nitrosilação da arginase pelas NOS são importantes fatores moduladores da produção de NO ^{73, 71}. Neste caso, o efeito cardioprotetor, isquemia seguida de reperfusão, também tem relação com a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, onde a deficiência de L-arginina compromete a formação de NO pela NOS, que transfere os elétrons para o oxigênio molecular originando radicais livres ^{71, 74, 75}. Assim, o controle da atividade arginínolítica tem sido considerado um ponto chave para compreensão fisiopatologia cardíaca ⁴⁵. O efeito de compostos cardioprotetores tem sido investigado sob a ótica de biomarcadores

enzimáticos (metabolismo energético, antioxidante e de compostos nitrogenados) e histopatológicos. O efeito protetor do crocin (pigmento carotenóide) e da betaína, no miocárdio de ratos submetidos à isquemia seguida de reperfusão, foram acompanhados pela redução nos níveis teciduais de arginases ^{46, 47}. Estudos com inibidores da atividade argininolítica, também revelaram melhora no quadro geral dos animais infartados em condições experimentais ^{45, 76}.

Um estudo com ratos pré-tratamento com betaína, seguido de infarto provocado com isoprenalina, revelaram que este composto apresenta efeito cardioprotetor capaz de manter os níveis de LDH plasmáticos próximos aos do grupo controle ⁴⁶. Já a determinação da atividade específica da LDH no tecido cardíaco reflete o potencial anaeróbio gerador de ATP do tecido. O pré-tratamento de ratos com crocin, um carotenóide encontrado no açafrão, seguido de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol, revelou que esse composto tem efeito cardioprotetor e é capaz de manter os níveis cardíacos de LDH próximos ao do grupo controle ⁴⁷. O pós-tratamento com IF não foi eficaz em elevar os níveis de LDH em relação ao grupo C. Já o pós-tratamento com ES apresentou efeito cardioprotetor mantendo os níveis da LDH mais elevados no tecido cardíaco. Neste estudo, houve uma maior expressão de LDH no grupo ES, evidenciando que o tecido isquêmico tem maior potencialidade para gerar ATP via metabolismo anaeróbio, o que é uma condição interessante para o músculo cardíaco, uma vez que aumenta a capacidade do tecido em superar a falta de O₂ imposta pela lesão cardíaca.

Com relação à expressão de MDH, utilizando ratos pré-tratados durante 30 dias com betaína e infartados com isoprenalina, Ganesan e colaboradores concluíram que este composto tem efeito cardioprotetor sobre a função mitocondrial ⁴⁶. Neste caso, a atividade mitocondrial média de MDH do grupo de ratos injetados com isoprenalina e pré-tratados com betaína durante 30 dias, foi cerca de duas vezes maior do que a atividade média do grupo sem pré-tratamento. Os autores também constataram que a concentração média de ATP no grupo pré-tratado com betaína foi o dobro em relação ao grupo não tratado.

Assim, neste estudo, o pós-tratamento dos ratos com IF e ES não foi capaz de elevar o potencial aeróbio gerador de ATP na musculatura cardíaca

dos ratos infartados porque houve menor expressão de MDH para o grupo ES, demonstrando que o tecido está se ajustando para trabalhar mais em anaerobiose (LDH) do que em aerobiose (MDH).

O efeito protetor do potencial aeróbio gerador de ATP observado por Ganesan e colaboradores no pré-tratamento com betaína está relacionado com o aumento do potencial antioxidante do miocárdio, considerando que os níveis das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase do grupo tratado com betaína, que foi cerca de 25 % maior em relação ao controle (dieta padrão e injetados com solução fisiológica) e 120 % maior em relação ao grupo infartado com isoprenalina (dieta sem betaína). Neste caso, os autores também observaram que os níveis de peróxidos lipídicos (LPO) estavam cerca de 200 % mais elevados no grupo de ratos infartados com isoprenalina sem pré-tratamento com betaína, quando comparado ao grupo pré-tratado com betaína ⁴⁶.

Ao que tudo indica, o dano ao tecido cardíaco não ocorre somente durante a fase isquêmica do infarto do miocárdio, mas, também, durante a sua reperfusão. A falta de oxigênio impede o funcionamento do sistema mitocondrial transportador de elétrons, saturando-o com elétrons. A reintrodução do oxigênio no tecido isquêmico reduz, de forma imprópria, o oxigênio e leva a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), acima do potencial de defesa antioxidante dos tecidos ^{77,78}. Nesse caso, o efeito protetor do pré-tratamento com betaína na recuperação do infarto do miocárdio estaria relacionado com o aumento do potencial aeróbio gerador de ATP associado ao aumento da defesa antioxidante ⁴⁶.

No presente estudo, o efeito do pós-tratamento com IF aumentou o potencial aeróbio gerador de ATP (MDH) em 17 % quando comparado ao grupo controle ($p=0,072$). Esse aumento, provavelmente, só estaria conferindo alguma vantagem protetora se estivesse associado ao aumento potencial da defesa antioxidante, como observado por Ganesan e colaboradores, trabalhando com betaína ⁴⁶.

Por outro lado, o tratamento com extrato de soja reduziu em 37 % os níveis de MDH, em relação ao grupo controle ($p<0,001$). O aumento do potencial anaeróbio gerador de ATP foi acompanhado pela manutenção dos volumes diastólico e sistólico finais em valores próximos àqueles observados

antes do infarto do miocárdio. Desta forma, o efeito redutor do ES sobre os níveis de MDH e aumento de LDH, aparentemente, conferiu vantagem protetora aos ratos no pós-infarto, considerando que as diferenças entre os volumes diastólico e sistólico finais, dos grupos IF e controle, no pré e pós-infarto, foram mais acentuadas.

O efeito protetor do ES na recuperação do infarto do miocárdio também foi marcante quando analisamos o conteúdo de colágeno na região de transição entre o tecido normal e o infartado. A pequena quantidade de colágeno maduro nessa região, comparado ao grupo controle e IF, indica que a região lesionada foi menor, o que pode ser explicado pelo amplo efeito modular do extrato de soja sobre o metabolismo desses ratos. O efeito redutor do ES sobre o potencial aeróbio gerador de ATP pode ter corroborado com a redução na formação de radicais livres na região lesionada ao longo do processo de reperfusão e, conseqüentemente, reduzido esta área. Por outro lado, a indução da LDH, proporcionada pelo ES, aumentou o potencial anaeróbio gerador de ATP e corroborou para manutenção da demanda energética sem aumentar o risco de formação de radicais livres.

Outro aspecto relevante, que diz respeito ao metabolismo do colágeno, reside no metabolismo do aminoácido L-arginina. A sua hidrólise, catalisada pela arginase, disponibiliza o aminoácido não protéico L-ornitina no meio intracelular, que pode ser utilizado na síntese do aminoácido prolina, que é abundante na estrutura do colágeno ⁷⁹. Neste caso, o efeito modulador negativo do ES sobre os níveis de arginase, reduziu potencialmente a disponibilidade de L-ornitina para a síntese de prolina e manteve níveis mais elevados de L-arginina para síntese de óxido nítrico, um importante modulador da função cardíaca.

Existe uma tendência de a soja estar induzindo a musculatura cardíaca, a uma alteração do perfil metabólico energético. Novos experimentos são necessários para verificar se o pré-tratamento com IF seria capaz de manter o potencial aeróbio gerador de ATP na musculatura cardíaca.

Com relação à anatomia patológica, foi utilizado, como parâmetro, o colágeno, que quantifica a presença de fibrose no infarto do miocárdio e na zona de transição entre o infarto e o miocárdio íntegro. Este método avalia a proliferação do colágeno, diferenciando o tipo e se é imaturo ou maduro,

permitindo que se reconheça a extensão do infarto do miocárdio, além da capacidade de remodelamento cardíaco. O que foi identificado no grupo ES no local 1, ou seja, na zona de transição entre o infarto do miocárdio e o miocárdio íntegro, foi uma menor quantidade de colágeno maduro, sugerindo que houve uma melhor proteção nesta região. Acredita-se que este efeito possa ter ocorrido em consequência da vasodilatação produzida pela maior presença do óxido nítrico disponível, fazendo com que tenha ocorrido uma melhor irrigação das células miocárdicas atordoadas ao redor do infarto, o que evita a morte celular.

O valor do colágeno total também foi inferior no grupo ES, apesar de que, na análise do colágeno imaturo, não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Com relação à frequência cardíaca, identificou-se que o grupo ES apresentou uma redução de forma significativa entre o período pré e pós-infarto do miocárdio. Em contrapartida, no grupo IF, identificou-se um aumento da FC.

Este parâmetro não pode ser analisado isoladamente, mas, sim, relacionado a outros parâmetros. Quando analisado, este dado do grupo ES e relacionado à estabilização da FE e o efeito anti-remodelamento sugere que este grupo apresentou um efeito protetor do miocárdio.

Com relação ao grupo IF, a despeito do aumento da FC, o ganho de peso pode ter sido em consequência da retenção hídrica, pois os animais deste grupo apresentaram queda da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com remodelamento ventricular, ou seja, sinais sugestivos de insuficiência cardíaca.

Com relação à análise funcional do grupo ES, identificou-se que houve uma estabilização da função cardíaca pós-infarto do miocárdio. Esta consideração é baseada no fato de que a FE, que garante o inotropismo cardíaco, não apresentou redução significativa, assim como os volumes ventriculares sistólico e diastólico não apresentaram aumento significativo. Foi observado um aumento dos volumes sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo em todos os grupos, entretanto, com significância estatística nos grupos controle e IF, evidenciando o efeito cardioprotetor do ES. Corroborando com Lin e colaboradores, onde houve melhora funcional cardíaca e diminuição

do infarto e dos parâmetros histológicos e hemodinâmicos com o uso de um alimento funcional, o polifenol, em modelo semelhante ao estudado nesta pesquisa ¹⁰.

Os mecanismos que justificam os efeitos benéficos do ES ainda não estão bem esclarecidos, mas, acredita-se que os flavonóides vegetais afetam positivamente a produção de NO, um potente vasodilatador, mediante indução da NOS *in vivo* e *in vitro* ⁸⁰. Os eventuais benefícios cardioprotetores do ES também podem estar relacionados ao conteúdo de L-arginina presente nas proteínas da soja e precursor da síntese de NO ⁸¹. A presença de menor quantidade de colágeno maduro no grupo ES também pode sugerir, indiretamente, uma maior quantidade de NO presente no tecido e, conseqüentemente, maior vasodilatação e poder de reperfusão da musculatura cardíaca.

Ainda, no grupo ES, o fato de ter sido identificado uma maior quantidade de LDH e uma menor de MDH indica que o músculo cardíaco criou mecanismos compensatórios que auxiliaram o tecido em recuperação. Assim, houve uma indução do perfil metabólico energético. O tecido isquêmico, do grupo ES, teve maior capacidade de gerar ATP através do metabolismo anaeróbio (atividade elevada de LDH).

Com relação à forma de administrar os alimentos, optou-se pela gavagem ^{50,51}, pois, apesar de causar um maior estresse para os animais, constituiu-se como a opção mais adequada de administração porque estudos comprovam que a IF, para ser absorvida e metabolizada com maior eficiência, necessita passar pelo metabolismo intestinal, o que eventualmente não ocorreria caso os animais ficassem sob livre demanda, além do fato de não ser identificada a dose correta de ingestão diária dos alimentos funcionais ⁸².

8 CONCLUSÕES

Neste estudo, houve um discreto efeito cardioprotetor do ES, em relação aos demais grupos e, contrariamente ao que se esperava, a IF não trouxe nenhum efeito positivo.

Também, houve um maior efeito cardioprotetor do ES, em relação aos demais grupos, em quase todas as variáveis analisadas, corroborando com o fato de que, em vários estudos científicos, sugere-se que a IF isolada perca parte do seu efeito funcional quando separada da proteína da soja.

Muitos estudos estimulam o uso da IF e da soja como uma solução segura e prevenção garantida para muitas enfermidades.

Porém, algumas considerações são importantes com relação à dieta com alimentos funcionais, pois o uso indiscriminado destes produtos deve ser evitado e sua toxicidade deve ser levada em consideração, principalmente em momentos de vida onde existe um desenvolvimento importante do indivíduo, como em relação às crianças e adolescentes e àquelas pessoas que possuem doenças graves ou condições fisiológicas especiais como as gestantes. A expectativa dos indivíduos é grande em se tratando de alternativas de melhora e cura e esta expectativa deve ser respeitada, evitando-se prometer reações e efeitos que nem sempre são uma realidade.

Muitos fatores podem ser influenciadores dos efeitos dos flavonóides nos indivíduos, como, por exemplo, as diferenças de cultura e de filosofias de vida, bem como o padrão de ingestão de alimentos e não se sabe até que ponto o efeito destes flavonóides são influenciados pelo contexto em que o indivíduo está inserido.

Mais estudos devem ser realizados para elucidar os reais benefícios e efeitos adversos da soja, dos derivados de soja e, principalmente, dos concentrados de IF. Estes estudos permitirão que haja um conhecimento profundo sobre as recomendações dietéticas adequadas para cada um destes componentes que são bioativos, criando consensos mundiais e específicos para cada país.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. Braunwald's Heart Disease: a textbook of Cardiovascular Medicine EUA, Saunders Elsevier, 2008.
2. SBC - Consenso brasileiro sobre trombólise. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre cuidados ao paciente infartado. Arq Bras Cardiol. 1994; 63 (supl.II): 1-8.
3. ACC/AHA (American College of Cardiology/American Heart Association - Task Force Report) 1999 Update: guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. Guideline. J Am Coll Cardiol. 1999; 34:890-911.
4. Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel JB, Mercadier JJ, Escoubet B. Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 283(1): H346-52.
5. DATASUS:<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.db2003/c08.def.In.2010>.
6. Murray CJL, Lopez AD. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. USA. Harvard School of Health, 1996.
7. Nagata C, Takatsuka N, Kurisu Y, Shimizu H. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. J Nutr. 1998; February: vol. 128 No. 2: 209-213.
8. Anthony M. Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. J Nutr. 2000; 130:662S-663S.
9. Ma SF, Guan SD, Zhu Y. Effect of soybean isoflavones on heart function of rats with adriamycin-induced heart failure. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2004; jul:2(4): 278-80.
10. Lin JF, Lin SM, Chih CL, Nien MW, Su HH, Hu BR, Huang SS, Tsai SK. Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats. Life Sci. 2008; Aug 29;83(9-10):313-7. Epub 2008 Jun 27.

11. Hasler C. Alimentos funcionais: seu papel na prevenção de doenças e na promoção da saúde. Chile: Institute of Food Technologists, 2001.
12. Fagundes RLM, Costa YR. Uso dos alimentos funcionais na alimentação. Hig Alim. 2003; maio: Vol. 17, Santa Catarina.
13. Rodriguez EB, Flavier ME, Rodríguez-Amaya DB, Amaya-Farfán J. Phytochemicals and functional foods. Current situation and prospect for developing countries. Seg Alim Nutric. 2006; 13 (1), jan/jun: 01-22.
14. Oliveira VR. Os benefícios das isoflavonas da soja na saúde humana. Rev. Nutr Pauta. 2003; nov/dez: Rio de Janeiro.
15. Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) / NEPA-UNICAMP. Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.
16. FAO/WHO. Protein quality evaluation: report of joint FAO/WHO expert consultation. Food and nutrition paper 51:1991.
17. FDA – Food and Drug Administration. US . Food labeling: health claims: soy protein and coronary heart disease. [http:// www.fda.gov](http://www.fda.gov), 1999.
18. Esteves E A, Monteiro JBR. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. Rev Nutr. 2001; jan/abr: Campinas, 14 (1): 43-52.
19. Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirchner AS, Cassidy A. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. J Nutr. 2001; 131: 1362S–1375S.
20. Queiroz S, Nogueira R, Scramim S. Importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana. EMBRAPA, 2006.
21. Carrão-Panizzi MC, Beléia ADP, Kitamura K, Oliveira MCN. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. Pesq Agropec Bras. 1999; v.34, n.10: 1787-1795.
22. Anderson JJB, Garner SC. Phytoestrogens and human function. Nutr Today, 1997; v.32, n.6: 232-239.
23. Setchell KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr. 1998; Bethesda, v.134, n.6, p.1333S-1343S.
24. Kurzer MS, XU X. Dietary phytoestrogens. Annu Rev Nutr. 1997; Palo Alto, v.17: 353-381.
25. Berferot C. Cozinha vegetariana: a soja no seu dia-a-dia. São Paulo: Cultrix, 2003.

26. Clapauch R, Meirelles R, Julião MA, Loureiro CK, Giaroli P, Pinheiro AS, Harrigan AR, Spritzer PM, Pardini D, Weiss RV, Athayde A, Russo LA, Povoa LC. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) Arq Bras Endocrinol Metab. 2002; vol.46 n°6.
27. Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. American J Nutr. 1984; Vol 40: 569-578.
28. Jackman KA, Woodman OL, Sobey CG. Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights. Curr Med Chem. 2007; 14: 2824-2830.
29. Lamartiniere CA, Wang J, Smith-Johnson M, Eltoum IE. Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. Toxicol Sci. 2002; 65: 228–238.
30. Harper CE, Cook LM, Patel BB, Wang J, Eltoum IA, Arabshari A, Shirai T, Lamartiniere CA. Genistein and resveratrol, alone and in combination, suppress prostate cancer in SV-40 Tag Rats. Prostate. 2009; November 1; 69(15): 1668–1682.
31. Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. Nutr Câncer. 1994; 21: 113–131.
32. Manjanatha MG, Shelton S, Bishop ME, Lyn-Cook LE, Aidoo A. Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats. Carcinogenesis. 2006; vol.27 no.12: 2555–2564.
33. Martins C, Miguez AC, Nascimento MM, Riella MC. O efeito da carga aguda de diferentes proteínas alimentares na taxa de filtração glomerular de indivíduos saudáveis. In: XVI Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral, Fortaleza, 2005.
34. Anisimova IN, Borovskii VR, Bychkova NG, Ratushniak VV, Klimenko LA, Osadchaia LA, Osadchaia OI, Bychkova SA. Role of enteral feeding mixture based on soy in correction of immune status of patients with burn wounds. Likars'ka sprava. 2005; Issue 8: 56-62.
35. www.anvisa.gov.br/visalegis. Acesso em 15/05/2010.
36. Santin M, Ambrosio L. Soybean-based biomaterials: preparation, properties and tissue regeneration potential. Expert Review of Medical Devices. 2008; May, Vol. 5, No. 3: 349-358.
37. Gleason CE, Carlsson CM, Barnet JH, Meade SA, Setchell KDR, Atwood CS, Johnson SC, Ries ML, Asthana S. A preliminary study of the safety,

feasibility and cognitive efficacy of soy isoflavone supplements in older men and women. *Age Ageing*. 2009; 38: 86–93.

38. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New Engl J Med*. 1995; 333:276-82.

39. Hagen MK, Lehenbauer-Lüdke AR, Paludo AC, Schenkel P, Gonçalves L, Fernandes TG, Caron R, Belló-Klein A. Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats with myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovas*. 2009; Volume 19, Issue 2, February, Pages 91-97.

40. Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, Del Soldato P. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *P Natl Acad Sci USA* 98. 2001; 4202-4208.

41. Kim JH, Bugaj LJ, Oh YJ, Bivalacqua TJ, Ryoo S, Soucy KG, Santhanam L, Webb A, Camara A, Sikka G, Nyhan D, Shoukas AA, Ilies M, Christianson DW, Champion HC, Berkowitz DE. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol*. 2009; 107: 1249-1257.

42. Post H, Pieske B. Arginase: a modulator of myocardial function. *Am J Physiol - Heart C*. 2006; 290: H1747-H1748.

43. Shah AM, MacCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Therapeut*. 2000; 86, 49-86.

44. Jung AS, Kubo H, Wilson R, House SR, Margulies KB. Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium. *Am J Physiol - Heart C*. 2006; 290: 1756-1762.

45. Jung C, Gonon AT, Sjöquist PO, Lundberg JO, Pernow J. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2010; 85: 147-154.

46. Ganesan B, Rajesh R, Anandan R, Dhandapani N. Biochemical studies on the protective effect of betaine on mitochondrial function in experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Health Sci*. 2007; 53: 671-681.

47. Goyal SN, Arora S, Sharma AK, Joshi S, Ray R, Bhatia J, Kumari S, Arya, DS. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Phytomedicine*. 2010; 17: 227-232.

48. www.cobea.org.br. Acesso em 17/07/2009.

49. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Faria-Neto JR, Oliveira AS,

Brofman PR. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol.* 2006; Aug 28;111(3):423-9. Epub 2005 Nov 10.

50. Budin P. & Crouzat E. *La pratique des accouchements.* Paris, Octave Doin, 1891.

51. Budin, P. & Demelin L. *Manuel pratique d'accouchements et d'atla itement.* Paris, Octave Doin, 1904.

52. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989; 2 (5): 358-67.

53. Sliva S. *Imunomodulação da nutrição enteral experimental associada à sepsis.* Curitiba, 2006. Dissertação de mestrado – PPGCS / PUCPR.

54. CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução 714, 20 de junho de 2002.

55. Childress JJ, Somero GN. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar Biol.* 1979; 52: 273-283.

56. Thuesen EV, McCullough KD, Childress JJ. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? *J Mar Biol Assoc UK.* 2005; 85: 603-611.

57. Iyama EW, Asakura T, Woods GM. A colorimetric microplate assay method for high-throughput analysis of arginase activity in vitro. *Anal Biochem.* 2008; 383: 332-334.

58. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

59. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11: 447-455.

60 Pagano M, Gauvreau K. *Princípios de bioestatística.* São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.

61 Mathew BC, Daniel RS. Effect of isoflavones on cardiovascular health: Low but not out either. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 43: 129-130.

62 Rimbach G, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Hall WL, Weinberg PD. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - a molecular perspective. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 1308-1319.

63 Martin D, Song J, Mark C, Eyster K. Understanding the cardiovascular actions of soy isoflavones: potential novel targets for antihypertensive drug development. *Cardiovasc Hemat Disord - Drug Targets*. 2008; 8: 297-312.

64 Alekel DL, Van Loan MD, Koehler KJ, Hanson LN, Stewart JW, Hanson KB, Kurzer MS, Petersone CT. The soy isoflavones for reducing bone loss (SIRBL) study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91: 218-230.

65 Taku K, Melby MK, Takebayashi J, Mizuno S, Ishimi Y, Omori T, Watanabe S. Effect of soy isoflavone extract supplements on bone mineral density in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010; 19: 33-42.

66 Butler LM, Wu AH, Wang R, Koh WP, Yuan JM, Yu MC. A vegetable-fruit-soy dietary pattern protects against breast cancer among postmenopausal Singapore Chinese women. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91: 1013-1019.

67 Crouse JR; Morgan T; Terry JG; Ellis J, Vitolins M, Burke GL. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amount of isoflavones on plasma concentration of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med*. 1998; v.159: 2070-2076.

68 Greaves KA; Parks JS; Williams JK; Wagner JD. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgous monkeys. *J Nutr*. 1999; v.129: 1585-1592.

69 Clarkson TB; Anthony MS; Morgan TM. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. *J Clin Endocr Metab*. 2001; v. 186: 41-47.

70. Schnorr O, Brossette T, Momma TY, Kleinbongard P, Keen CL, Schroeter H, Sies H. Cocoa flavonols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 476: 211-215.

71. Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiol Rev*. 2009; 89, 481-534.

72. Cerra MC, Pellegrino D. Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions. *Curr Med Chem*. 2007; 14: 585-599.

73. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle: autocrine and paracrine influences. *Arterioscl Throm Vas*. 1997; 17: 1846-1858.

74. Cotton JM, Kearney MT, Shah AM. Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? *Heart*. 2002; 88: 564-566.

75. Shah AM, MacCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Therapeut.* 2000; 86: 49-86.
76. Lorenzen JM, Ückert S, Scheller F, Haller H, Kuczyk MA. Effects of arginase inhibitors on the contractile and relaxant responses of isolated human penile erectile tissue. *World J Urol.* 2009; v. 27, n. 6: 805-810.
77. Cadenas S, Aragonés J, Landázuri MO. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 2010; 88: 219-228.
78. Correa F, Martínez-Abundis E, Hernández-Reséndiz S, García N, Buelna-Chontal M, Arreguín F, Zazueta C. Pharmacological strategies to contend against myocardial reperfusion damage: diverse chemicals for multiple targets. *Curr Med Chem.* 2010; 17: 2261-2273.
79. Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, Li P, Li X, McKnight JR, Satterfield MC et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids.* 2010; 1-11.
80. Schmitt CA, Dirsch VM. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide - Biol Ch.* 2009; 21: 77-91.
81. Lissin LW, Oka R, Lakshmi S, Cooke JP. Isoflavones improve vascular reactivity in post-menopausal women with hypercholesterolemia. *Vasc Med.* 2004; 9: 26-30.
82. Ren MQ, Kuhn G, Wegner J, Chen J. Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. *Eur J Cancer.* 2001; v.40: 135-146.