

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**INFLUÊNCIA DAS ISOFLAVONAS DE SOJA NA PRODUÇÃO DE
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E ÓXIDO NÍTRICO NA
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA DIETA**

ISABELA ROSIER OLIMPIO PEREIRA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profª. Assoc. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2000

16.384

DEDALUS - Acervo - CQ



30100003167

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P436i **Pereira, Isabela Rosier Olimpio**
Influência das isoflavonas da soja na produção de proteínas de choque térmico e óxido nítrico na aterosclerose experimental induzida pela dieta / Isabela Rosier Olimpio Pereira. — São Paulo, 2000.
125p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra

1. Bioquímica dos alimentos 2. Aterosclerose : Medicina
3. Soja : Ciência dos alimentos I. T. II. Abdalla, Dulcinéia Saes Parra, orientador.

641.1 CDD

ISABELA ROSIER OLIMPIO PEREIRA

INFLUÊNCIA DAS ISOFLAVONAS DE SOJA NA PRODUÇÃO DE
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E ÓXIDO NÍTRICO NA
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA DIETA

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof^a. Associada Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientador / Presidente

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
1º Examinador

Prof^a. Dr^a. Sílvia Berlanga de Moraes Barros
2º Examinador

São Paulo, 31 de outubro de 2000

A DEUS

Oh, profundidade da riqueza, tanto da sabedoria, como do conhecimento de Deus !

Quão insondáveis são os seus juízos e inescrutáveis seus caminhos!

Quem conheceu a mente do nosso Senhor ?

Quem primeiro deu a Ele para que venha a ser restituído ?

Por que dEle, por meio dEle e para Ele são todas as coisas.

A Ele, pois, a glória eternamente.

Ao meu pai, Gabriel, que mesmo calado, sempre deixou transparecer seu amor através do seu suor e sacrifício pela família.

A minha mãe, Mércia, pelo seu amor incondicional, dedicação e compreensão. Pelas noites mal dormidas e as horas de preocupação diante da distância que nos separa.

Aos meus irmãos, Márcia (Caca), Gabriela (Biela), René (Dedé) e Marcela (Teta), pelos laços que nos unem. Aos meus sobrinhos, Caio, Gabriel e Bruno, pela alegria que trazem. Aos meus cunhados, Ubiratan e Luís Roberto pelo apoio. À vovó Aurelina, às tias Melânia, Milena, Mertiza, Socorro, Salete e Sandra e aos tios Iraê, Iberê, Irandê e Flávio e aos meus primos por todo carinho desde a infância até hoje.

Ao meu namorado, Mario, pelo seu amor, apoio, incentivo e compreensão tanto nas horas de alegria, como nos momentos de dificuldade. Pelo exemplo de luta e esforço por uma vida melhor!

À professora Dulcineia, pela confiança depositada, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

A Osmundo Brilhante (Brilho), pela sua amizade, pelo incentivo à pesquisa e principalmente, por ter me ensinado o que é e como é o mundo da ciência. Às companheiras de estudo, Adriana, Alana, Ana Gláucia, Elicélia e Joelma, pelas noites mal dormidas. Aos meus amigos, Manoel e Márcia Viviane pelo contato mesmo à distância.

À Joelma e Simone Marilene, pela amizade sincera e pelo espaço que compartilhamos. Aos companheiros do laboratório: Nágila, pelo apoio na minha chegada e pela colaboração nesse trabalho, Patrícia, pela amizade e pelos ensinamentos, Alvorita, pelo exemplo de vida, Éder, Emersom, Edimar, Daniela e Simone, por "sofrermos" juntos. E aos alunos de iniciação científica: Elaine, Alexis, Fernanda, Juliana e Fabiana por todo sacrifício e pela grande participação nesse trabalho. Aos amigos, Ana Wlândia, Manuela, Nara, Helena, Denise, Karenina e Ivan.

Aos que, de alguma forma, auxiliaram nesse trabalho: Professores Leoberto Tavares, pela grande contribuição na extração de isoflavonas, e Fernando Moreno, Professoras Elvira, Aparecida Nicoletti, Adelaide Vaz e Silvia Berlanga; Cleyton Alves, pelas análises imunohistoquímicas; Teresa Barretto (Rhoster) pelo preparo da ração; Leila, pela revisão bibliográfica, Graça, Míriam, Edgar, Lúcia, Flávio, Alessandra, Sônia, Tânia, etc. Aos departamentos de Alimentos e Nutrição Experimental, Análises Clínicas e Toxicológicas e Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

A Ceval Alimentos pelo fornecimento da molassa da soja.

À Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (bolsa de mestrado - processo 98/02356-5 e projeto temático - processo 97/05090-3).

ABREVIATURAS

ADMA	Dimetil-arginina assimétrica
ADP	Adenosinatrifosfato
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
DAB	Diamino-benzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dietiltreitol
EDRF	Fator de relaxamento vascular dependente do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	β -hidroxi β -metil glutaril-coenzima A
HSP	Proteína de choque térmico
HSP60	Proteína de choque térmico 60
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HSC70	Proteína de choque térmico constitutiva 70
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LPS	lipopolissacarídeo
MPO	mieloperoxidase
*NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS _e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS _i	Óxido nítrico sintase indutível
NOS _n	Óxido nítrico sintase neuronal
NO _x	Nitrito + nitrato
O ₂ ⁻	superóxido
ONOO ⁻	peroxinitrito
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonil
TNF	Fator de necrose tumoral
v/v	Volume/volume
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Oxidação de Lipoproteínas e Formação de Óxido Nítrico na Aterosclerose.....	01
1.2. Expressão de Proteínas de Choque Térmico (HSP) e Formação de Auto-anticorpos Anti-HSPs na Aterosclerose.....	08
1.3. Nutrição e Modulação da Aterogênese.....	12
1.4. Isoflavonas e Aterosclerose.....	20
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Desenho Experimental.....	29
3.2. Animais.....	29
3.3. Modelo Dietético.....	30
3.4. Extração de Isoflavonas.....	32
3.4.1. Molassa.....	32
3.4.1.1. Determinação de Saponinas.....	34
3.4.2. Ração.....	35
3.4.3. Plasma e Urina.....	36
3.5. Determinação de Isoflavonas.....	37

3.6. Purificação de Lipoproteínas.....	37
3.7. Análises Lipídicas e de Proteína.....	38
3.8. Análise Morfométrica.....	38
3.9. Extração realizada na Aorta para Determinação de Colesterol e Nitrato.....	39
3.10. Determinação de Nitrato.....	40
3.11. Imunohistoquímica.....	40
3.11.1. Preparação das amostras de aorta.....	40
3.11.2. Detecção de Óxido Nítrico Sintase Indutível, Nitrotirosina e Proteínas de Choque Térmico na aorta.....	41
3.12. Análise de Imagens.....	41
3.13. Extração e Purificação de IgG da Aorta dos Coelhos.....	42
3.14. Detecção de Autoanticorpos Anti-proteínas de Choque Térmico no Soro e na IgG Purificada da Aorta.....	43
3.15. Análise Estatística.....	44
4.0. RESULTADOS.....	46
4.1. Padronização da Extração de Isoflavonas da Molassa.....	46
4.1.1. Extração Laboratorial.....	46
4.1.2. Extração Semi-Industrial.....	49
4.2. Consumo de Ração e Peso do Animais.....	51

4.3. Concentrações de Isoflavonas no Plasma e na Urina.....	52
4.4. Cromatograma de Isoflavonas obtido por HPLC.....	54
4.5. Perfil Lipídico e Protéico.....	56
4.6. Concentração de Nitrato no Plasma e na Aorta.....	66
4.7. Expressão de iNOS e Nitrotirosina.....	68
4.8. Expressão de Proteínas de Choque Térmico.....	71
4.9. Autoanticorpos Anti-proteínas de Choque Térmico.....	73
4.10. Distribuição, Área e Volume das Lesões Ateroscleróticas.....	77
5.0. DISCUSSÃO	83
6.0. CONCLUSÕES.....	99
7.0. RESUMO.....	100
8.0. ABSTRACT.....	102
9.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Oxidação de Lipoproteínas e Formação de Óxido Nítrico na Aterosclerose

A aterosclerose, que a princípio, representa uma resposta protetora a estímulos lesivos, é considerada uma doença multifatorial, cujos mecanismos bioquímicos ainda não são totalmente compreendidos (Ross, 1993). Histologicamente, lesões ateroscleróticas são caracterizadas pela proliferação de células da íntima da parede arterial, acúmulo de lipídeos e deposição de componentes da matriz extracelular. Placas ateroscleróticas completamente desenvolvidas contêm numerosos macrófagos e células musculares lisas carregados de lipídeos (*foam cells* ou células espumosas) e cristais de colesterol no espaço extracelular. (Wick *et al.*, 1995)

As modificações oxidativas das lipoproteínas e, particularmente da LDL, são consideradas essenciais à patogênese da aterosclerose (Nilsson, 1992; Westhuyzen, 1997). Espécies oxidantes liberadas por células endoteliais, musculares lisas, monócitos, neutrófilos, macrófagos e plaquetas podem modificar oxidativamente as lipoproteínas (Silva *et al.*, 1995). No espaço subendotelial, LDL oxidada pode agir como um agente quimiotático para monócitos que aderem ao endotélio, migram para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos (Wick *et al.*, 1995). A LDL oxidada é captada por macrófagos e células musculares lisas que possuem os receptores *scavenger*, os quais não sofrem regulação por *feedback* negativo, permitindo a internalização de um grande número de partículas de LDL modificada, o que transforma estas células em *foam*

cells. De acordo com Fries *et al.* (1995), a LDL oxidada induz uma maior liberação de óxido nítrico em culturas de células endoteliais de aorta, em relação à LDL nativa.

O óxido nítrico (*NO) é um radical livre com características especiais. O *NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) que catalisam a oxidação de um nitrogênio guanidínico da L-arginina para formar óxido nítrico e citrulina (Moncada, 1991). Há três isotipos de NOS. O *NO sintetizado pela NOS neuronal constitutiva (NOS_n), que existe principalmente no sistema nervoso central, age como um neurotransmissor. O *NO sintetizado pela NOS endotelial constitutiva (NOS_e), em células endoteliais, é reconhecido como fator de relaxamento vascular dependente do endotélio (EDRF) e regula o tônus vascular e o fluxo sanguíneo. A NOS indutível (NOS_i) é amplamente distribuída em muitos tipos de células incluindo macrófagos, células musculares lisas, miócitos cardíacos, hepatócitos e megacariócitos e é ativada quando estas células são estimuladas por várias citocinas (Shimizu *et al.*, 1997). O óxido nítrico é sintetizado em baixas concentrações e por curtos períodos de tempo pela enzima óxido nítrico sintase endotelial constitutiva, promovendo uma vasodilatação contínua no sistema cardiovascular. A NOS_e requer cálcio e calmodulina como cofatores (Forstermann *et al.*, 1991). Após sua liberação, o óxido nítrico interage com o grupo heme da guanilato ciclase, levando à produção de GMP cíclico que é responsável pela vasodilatação (Vallance e Moncada, 1993) e está relacionado à inibição da agregação plaquetária, aos sinais de neurotransmissão e à regulação imune (Stamler *et al.*, 1992). Situações de estresse induzidas pela presença de bactérias, vírus ou outros agentes agressores ao organismo,

associadas à liberação de endotoxinas ou citocinas, tais como interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon γ estimulam a síntese de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase indutível, em grandes quantidades e por longos períodos de tempo. O óxido nítrico liberado pela enzima indutível também estimula a guanilato ciclase, mas tem efeitos tóxicos adicionais que são independentes do GMP cíclico. Este mecanismo está relacionado a diversos processos fisiopatológicos, tais como o choque séptico (Vallance e Moncada, 1993) e a aterosclerose (Pomerantz *et al.*, 1993). O óxido nítrico produzido por esta enzima protege o hospedeiro contra o agente agressor através da sua ação citotóxica e citostática, que envolve inibição da respiração mitocondrial, lesão do DNA, reação com espécies reativas de oxigênio (Vallance e Moncada, 1993), nitração e nitrosilação de proteínas, inibição de enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo, ligação com grupos FeS em proteínas e ribosilação de ADP (Moncada *et al.*, 1991; Nathan, 1992). NOSi é expressa em artérias coronárias ateroscleróticas de humanos (Buttery *et al.*, 1996).

Apesar de diversos estudos *in vitro* e *in vivo* terem demonstrado a relação entre as lipoproteínas oxidadas e o aumento da síntese de óxido nítrico, a ligação entre o óxido nítrico e a aterosclerose é ainda alvo de muita controvérsia. Muitas condições patológicas, incluindo isquemia/reperfusão, inflamação e a deficiência de tetrahydrobiopterina, um cofator para a síntese de *NO , podem induzir a produção simultânea de radical superóxido (O_2^-) e *NO em diversos tecidos (Lancaster, 1996). Há evidências de que o óxido nítrico seja produzido em maior quantidade nas artérias ateroscleróticas, mas não promoveria uma vasodilatação adequada,

pois reagiria rapidamente com o $O_2^{\cdot-}$, gerando peroxinitrito (Huie & Padmaja, 1993), que possui potencial oxidante bem maior que o dos radicais $\cdot NO$ e $O_2^{\cdot-}$. O peroxinitrito (ONOO \cdot) se decompõe em outras espécies reativas de oxigênio (Figura 1) (Lancaster, 1996) e reage com resíduos tirosina de proteínas para formar nitrotirosina (Beckman *et al.*, 1992). A presença de nitrotirosina na urina de indivíduos com aterosclerose (Oshima *et al.*, 1990) e a diminuição do relaxamento das artérias ateroscleróticas de animais e humanos (Minor *et al.*, 1990) são fortes indicadores de que a inativação do óxido nítrico, com a conseqüente formação de peroxinitrito, possa ocorrer *in vivo*. Embora pouco se saiba sobre os efeitos da nitração de tirosina na função protéica *in vivo* (Beckman *et al.*, 1994), tem sido mostrado que peroxinitrito e seus produtos de decomposição induzem a peroxidação de lipídios de membrana (Radi *et al.*, 1991) e podem iniciar a peroxidação lipídica da LDL humana (Darley-Usmar *et al.*, 1992), provocando lesão endotelial e aumento da permeabilidade vascular (Lancaster, 1996). Por alterar o estado redox celular, o peroxinitrito pode também induzir a expressão de genes redox-sensíveis, tais como o da molécula de adesão celular-1, a qual participa do recrutamento de células inflamatórias para a superfície endotelial (Marui *et al.*, 1993). É possível, portanto, que a elevada produção de peroxinitrito seja um fator contribuinte para a progressão da aterosclerose. Diversos estudos indicam que a deficiência no relaxamento vascular dependente do endotélio, presente na aterosclerose, está associada à diminuição na síntese ou liberação de óxido nítrico. Postula-se que esta alteração da reatividade vascular poderia estar relacionada a diversos fatores, tais como, deficiência de arginina (Cooke *et al.*, 1991), interação da lisofosfatidilcolina com as

membranas celulares (Kugiyama *et al.*, 1990) ou, ainda, pelas alterações no fluxo sanguíneo (Hutcheson *et al.*, 1994). Portanto, os mecanismos responsáveis pelo distúrbio na vasodilatação dependente do óxido nítrico, na aterosclerose, ainda devem ser esclarecidos.

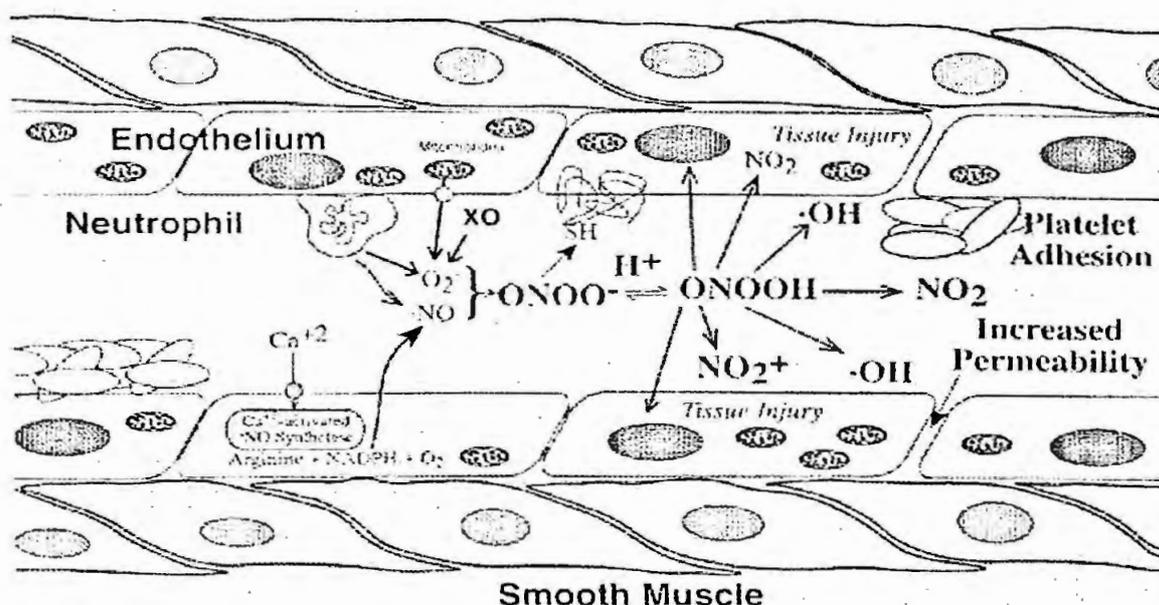


Figura 1-Geração de peroxinitrito no compartimento vascular como resultado de isquemia/reperfusão (Lancaster, 1996)

O $\cdot\text{NO}$ pode atuar tanto como oxidante quanto como antioxidante. Jessup *et al.* (1996) mostraram que o $\cdot\text{NO}$ não oxida diretamente a LDL. Alguns autores sugerem que o óxido nítrico é o principal fator envolvido nas propriedades anti-ateroscleróticas do endotélio. O $\cdot\text{NO}$ diminui a permeabilidade endotelial e reduz o tônus vascular, diminuindo assim, o fluxo de lipoproteínas para o interior da parede arterial (Draijer *et al.*, 1995), além disso, a inibição da enzima eNOS promove o desenvolvimento acelerado da aterosclerose em modelos experimentais (Cayatte *et al.*, 1994). Fatores de risco para a aterosclerose, tais como hipercolesterolemia, diabetes, hipertensão e fumo têm sido associados a alterações da atividade do $\cdot\text{NO}$ (Stroes *et*

al, 1995). Hipercolesterolemia pode ser associada com o aumento das concentrações circulantes de ADMA (dimetil-arginina assimétrica), um inibidor endógeno da NOS (Bode-Böger *et al.*, 1996). Isso é particularmente interessante porque essas observações sugerem que a administração de L-arginina poderia superar uma inibição competitiva da NOS (Wever *et al.*, 1998). Boger *et al.* (1995) observaram que a suplementação da dieta de coelhos hipercolesterolêmicos com 2% de L-arginina aumenta a vasodilatação dependente de *NO e bloqueia a progressão da placa aterosclerótica. Entretanto, a concentração intracelular normal de L-arginina excede os valores de K_m da NOS (Arnal *et al.*, 1995), sugerindo que um excesso de L-arginina não provocaria um aumento da atividade de NOS. Giugliano *et al.* (1997) demonstraram que o efeito da L-arginina na vasodilatação é mediado, em parte, por estimulação da secreção de insulina. Outros estudos ainda concluem que a LDL oxidada impede a liberação (ou a ação) de *NO de artérias normais (Chin *et al.*, 1992; Kugiyama *et al.*, 1990), o que pode contribuir para a adesão de plaquetas e o vasospasmo, que estão envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose (Levine *et al.*, 1995).

Uma possível via para a modificação da LDL *in vivo* seria através de espécies reativas de nitrogênio. Estudos imunohistoquímicos demonstraram que a nitrotirosina, um biomarcador da lesão de proteínas por intermediários reativos nitrantes, está aumentada na íntima aterosclerótica humana. A mieloperoxidase (MPO), uma hemoproteína secretada por neutrófilos e monócitos (Eiserich *et al.*, 1998; Jiang & Hust, 1997), que está aumentada em lesões ateroscleróticas (Daugherty *et al.*, 1994), pode gerar intermediários nitrantes que modificam a LDL (Podrez *et al.*, 1999). Dois caminhos

alternativos para a geração de espécies reativas de nitrogênio foram recentemente descritos e envolvem a MPO (figura 3). A LDL isolada de ateromas humanos é enriquecida em clorotirosina, que é um produto específico formado pela reação entre o ácido hipocloroso (HClO) gerado pela MPO e os resíduos de tirosina das proteínas (Hazen *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstraram que a MPO isolada pode usar nitrito como substrato para nitrar resíduos de tirosina de proteínas e iniciar a peroxidação lipídica (Podrez *et al.*, 1999). As espécies reativas de nitrogênio formadas durante a oxidação do nitrito, catalisada pela MPO, ainda não foram identificadas, mas tem sido sugerido que o dióxido de nitrogênio (NO_2) possa estar envolvido (van der Vleit *et al.*, 1997). Finalmente, a MPO pode também indiretamente gerar um intermediário nitrante através da oxidação secundária do nitrito com HClO, formando nitrilcloreto (NO_2Cl). A LDL modificada por NO_2Cl é fagocitada por macrófagos (Panasenکو *et al.*, 1997).

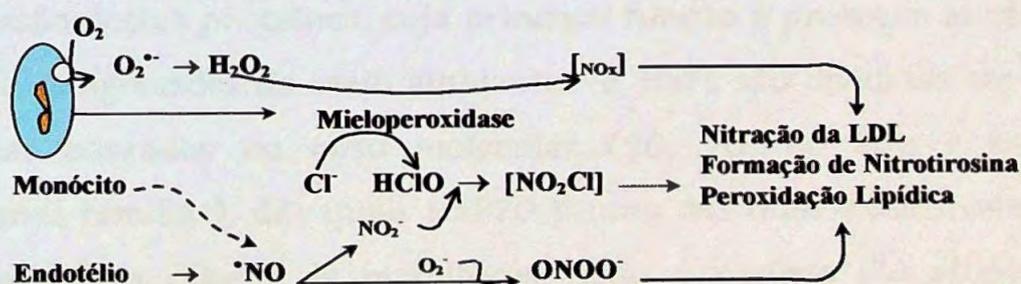


Figura 3 - Modelo de geração de oxidantes derivados do NO por monócitos (Adaptado de Hazen *et al.*, 1999).

1.2. Expressão de Proteínas de Choque Térmico (HSP) e Formação de Auto-anticorpos Anti-HSPs na Aterosclerose

Além dos diversos estudos demonstrando a ação do óxido nítrico sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio e a formação de produtos altamente reativos, derivados da sua reação com o radical superóxido, estudos *in vitro* mostram que a síntese elevada deste radical livre está diretamente associada à expressão de proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP) nos diversos tipos celulares (células endoteliais, musculares lisas e monócitos/macrófagos) presentes em lesões ateroscleróticas (Hirvonen *et al.*, 1996; Xu, *et al.*, 1997; Malyshev *et al.*, 1996).

Proteínas de estresse ou de choque térmico formam uma família de cerca de 20 proteínas que apresentam uma elevada homologia entre as espécies (desde as bactérias até os humanos). Em situações de estresse como as infecções, a febre, a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio ou estresse mecânico, ocorre um aumento da expressão destas proteínas, cuja principal função é proteger as células contra as agressões do meio ambiente. As HSPs são divididas em sub-famílias baseadas no peso molecular (90, 70, 60 kDa e outras pequenas famílias), das quais HSP70 é uma das mais extensivamente estudadas em células de mamíferos. Estas proteínas são altamente conservadas através da evolução e desempenham papéis essenciais como “chaperonas” moleculares sob condições normais e de estresse, por facilitarem o dobramento de proteínas nascentes, resolubilizando proteínas agregadas e participando no redobramento de proteínas desnaturadas (Laszlo *et al.*, 1988; Langer *et al.*, 1991). HSPs

desempenham um importante papel nas reações imunes, em condições normais e patológicas, através do envolvimento no processamento e apresentação de antígenos e no enovelamento das imunoglobulinas, além de poder participar na patogênese de processos auto-imunes via reatividade cruzada (Young e Elliott, 1989; Kaufmann, 1990). Em condições de estresse, as HSPs movem-se do citoplasma para o núcleo. Seu efeito protetor contra lesão oxidativa pode resultar de uma proteção contra lesão do DNA induzida por oxidantes (Hirvonen, 1996).

A família 70 kDa está presente no núcleo e no citosol das células. É composta por membros constitutivos (HSC70 - constitutiva ou cognata) e indutíveis (HSP70). Além da sua expressão constitutiva, a HSC70 é também moderadamente induzida pelo estresse (Walton *et al.*, 1994). A expressão de HSP70 parece ser constitutiva em alguns tipos de células, entretanto, um aumento da expressão desta proteína é observado nestas células em condições de estresse (Bellmann *et al.*, 1996).

Há evidências de que o aumento da produção de *NO estimule o aumento da expressão de HSP70 e HSC70 em vários tipos celulares. Em células musculares lisas, o *NO induz a expressão de HSP70 (Xu *et al.*, 1997). A ativação de macrófagos com LPS e $INF-\gamma$ não resultou na expressão da forma indutível HSP70, mas em um aumento de duas vezes na expressão de HSC70 (Hirvonen, 1996). Alguns estudos mostram que um aumento da síntese das HSPs leva a uma inibição da expressão de iNOS (Hauser *et al.*, 1996; Scarim *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1995). A indução da HSP70 por arsenito de sódio inibe a expressão do gene iNOS, mediada pela interleucina-1, em cultura de células musculares lisas (Wong *et al.*, 1995). Células endoteliais expostas ao

estresse térmico, em altas temperaturas, ou a citocinas como TNF- α , ou IL-1, expressam HSP60 na superfície celular e no citoplasma. O "shear stress" induz a expressão de HSP60 em células endoteliais *in vitro* e *in vivo* (Hochleitner *et al.*, 2000). HSP60, HSP70 e HSC70 estão presentes em lesões ateroscleróticas humanas (Kol *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 1995). A expressão das HSPs está aumentada em células endoteliais e em macrófagos presentes nas lesões (Xu *et al.*, 1993-b).

O aumento da expressão dessas proteínas por diversas células pode fazer com que sejam consideradas estranhas ou "altered self" pelo sistema imune, sendo, portanto, capazes de induzir uma reação auto-imune (Xu *et al.*, 1993-a). A imunização de coelhos com HSP65 levou à formação de lesões ateroscleróticas "*per se*", que foram agravadas pela presença de hipercolesterolemia (Xu *et al.*, 1992, 1996, Afek *et al.*, 2000). Estes autores postularam que a aterosclerose pode representar, a princípio, uma doença auto-imune, que se agrava pela presença de fatores de risco, tais como as hiperlipidemias, o tabagismo e a hipertensão, ou seja, fatores associados a uma situação de estresse e, portanto, capazes de induzir a expressão das proteínas de choque térmico, conforme verificado por Prummel *et al.* (1997) e Wick *et al.* (1995). Neste contexto, fatores que possam modificar a expressão destas proteínas possivelmente seriam capazes de alterar o desenvolvimento da aterosclerose. Apesar destes estudos, Hoppichler *et al.* (1996) não encontraram relação entre a expressão das proteínas de choque térmico e estes fatores de risco associados à aterosclerose.

Anticorpos anti-HSPs estão presentes na circulação de humanos saudáveis, mas ausentes em animais livres de patologias específicas,

sugerindo que a indução de anticorpos anti-HSP depende largamente da exposição a infecções (Xu *et al.*, 1993-a). Anticorpos contra HSP60, HSP70 e HSC70 estão aumentados no soro de pacientes com doenças cardiovasculares, comparados com os de controles saudáveis (Portig *et al.*, 1997). Títulos aumentados de anticorpos anti-HSP65 são associados com lesões ateroscleróticas (Xu *et al.*, 1999). O possível papel de anticorpos circulantes anti-HSP65 na aterogênese pode envolver uma reação auto-imune contra células endoteliais que expressam altos níveis de HSPs devido ao estresse, tais como infecções locais e estresse hemodinâmico.

Macrófagos presentes nas lesões ateroscleróticas reagem positivamente com anticorpos anti-HSP65, o que pode resultar na lise da célula, mediada por complemento, o que pode contribuir para a progressão da doença e formação do centro necrótico em lesões avançadas (Xu *et al.*, 1994; Schett *et al.*, 1997). Fisiologicamente, a HSP60 pode manter certos polipeptídeos em seu estado não-enovelado, facilitando sua translocação através da membrana. Nesse processo, uma porção da molécula da HSP60 poderia se estender da membrana plasmática celular para a superfície (Kiessling *et al.*, 1991), permitindo que reajam com anticorpos séricos.

Embora a expressão das proteínas de choque térmico seja estimulada pela presença de óxido nítrico, conforme tem sido verificado em estudos *in vitro* (Malyshev *et al.*, 1996; Bellmann *et al.*, 1996; Hirvonen *et al.*, 1996, Xu *et al.*, 1997), ainda não foi estabelecido se a modificação da produção de óxido nítrico *in vivo* pode alterar a expressão das proteínas de choque térmico (Malyshev *et al.*, 1996) e qual a relevância deste evento sobre a progressão da aterosclerose.

1.3. Nutrição e Modulação da Aterogênese

As modificações das lipoproteínas constituem um passo crítico para o desenvolvimento da aterosclerose. Neste contexto, o conteúdo de lipídeos e antioxidantes associados a estas partículas representam um fator determinante para a sua susceptibilidade à oxidação.

Estudos desenvolvidos em animais e humanos têm verificado uma relação indireta entre as concentrações de antioxidantes e as modificações oxidativas das lipoproteínas. Estes estudos envolvem substâncias não enzimáticas lipossolúveis (β -caroteno e α -tocoferol) e hidrossolúveis (urato, ascorbato, flavonóides, albumina, transferrina, bilirrubina) que podem ou não estar diretamente associadas às lipoproteínas, mas que atuam de modo indireto protegendo estas partículas das modificações oxidativas. Alguns minerais, como o cobre, zinco, manganês e selênio, também são considerados essenciais ao sistema de defesa antioxidante enzimático (CuZn e Mn-superóxido dismutase, Se-glutationa peroxidase). Portanto, um nível adequado de antioxidantes, em animais e/ou humanos, promove uma proteção ao organismo, em especial, contribuindo para tornar as lipoproteínas menos susceptíveis a modificações oxidativas. Recentemente, alguns estudos têm investigado o potencial antioxidante de substâncias conhecidas como nutracêuticos, tais como, saponinas e flavonóides, dentre os quais, as isoflavonas. As isoflavonas e, particularmente, a genisteína vêm demonstrando ter um elevado potencial antioxidante em estudos *in vitro* e *in vivo* (Ruiz-Larrea et. al., 1997; Tikkanen et al., 1998).

Desde os estudos pioneiros de Ignatowski (1908), sabe-se que fatores nutricionais podem modificar o perfil lipídico plasmático e

celular. Em 1913, Anitschkow e Chalатов verificaram que o colesterol é um destes nutrientes e, portanto, este passou a ser o principal alvo das investigações relacionadas com a aterosclerose. Nos últimos cinquenta anos, tem sido demonstrado que nutrientes de origem não lipídica também têm influência potencial no processo aterosclerótico. Dentre esses, temos as fibras, os carboidratos, as proteínas (Hamilton & Carrol, 1976), as vitaminas (Wilson, 1978) e os minerais (Linder, 1991).

Em relação às proteínas, não só a origem (vegetal ou animal), mas também o tipo de proteína são determinantes no seu papel pró ou anti-aterogênico. De acordo com Hamilton & Carrol (1976), a caseína é aterogênica mesmo na ausência de suplementação da dieta com colesterol. Dietas com misturas de aminoácidos correspondentes aos da caseína produzem uma elevação do colesterol plasmático similar àquela obtida com a caseína pura. Estes resultados sugerem que o efeito hipercolesterolêmico da caseína está relacionado à sua composição de aminoácidos (Huff et al, 1977). Aminoácidos essenciais ou, mais precisamente, uma elevada proporção Lisina/Arginina parecem estar relacionados à ação aterogênica da caseína (Kurowska e Carrol, 1994; Kritchevsky e Czarnecki, 2000) .

Em coelhos, uma dieta aterogênica com alto conteúdo de colesterol induz um aumento acentuado do colesterol plasmático, decorrente do acúmulo de β -VLDL (remanescentes de quilomícrons e VLDL). A dieta aterogênica baseada na administração de caseína não induz um aumento grosseiro na fração β -VLDL, mas sim, uma hipercolesterolemia decorrente, principalmente, do aumento da LDL, similar ao que tem sido visto em humanos com hipercolesterolemia, tornando esse modelo experimental preferível.

O mecanismo envolvido na aterogenicidade da caseína envolve a diminuição do catabolismo hepático do colesterol, da remoção hepática da LDL e o aumento da produção de LDL (figura 2; revisto por Pfeuffer, 1989 e Beynen *et al.*, 1986). A caseína, comparada com a proteína da soja, aumenta a absorção de colesterol e ácidos biliares no intestino (Nagata *et al.*, 1982 e Huff & Carrol, 1980). Esse aumento do fluxo de colesterol e ácidos biliares para o fígado reduz a excreção fecal de esteróides, a conversão de colesterol a ácidos biliares (Huff & Carrol, 1980), devido à inibição da 7α -hidroxilase (Vanhouny *et al.*, 1985), que é a enzima limitante da velocidade de biossíntese dos ácidos biliares, além de aumentar a concentração de colesterol no fígado (Huff & Carrol, 1980). Esse aumento de colesterol hepático tem duas implicações importantes: 1) promove uma inibição da HMG-CoA redutase, por um mecanismo de “feedback” negativo, inibindo a síntese *de novo* do colesterol (Kurowska *et al.*, 1996) e 2) induz uma hiporregulação do receptor B/E no fígado, diminuindo a internalização e o subsequente catabolismo da LDL (Scarabottolo *et al.*, 1986). O aumento de colesterol nos hepatócitos resulta também em uma excreção aumentada de colesterol associada às lipoproteínas contendo apoproteína B. A caseína não afeta a produção de apoproteína B da VLDL (Cohn *et al.*, 1985), porém tem sido detectada uma secreção aumentada de β -VLDL, uma captação hepática mais lenta dos remanescentes da VLDL (devido à hiporregulação dos receptores B/E) e uma conversão aumentada de VLDL à IDL e LDL (Daley *et al.*, 1994-a).

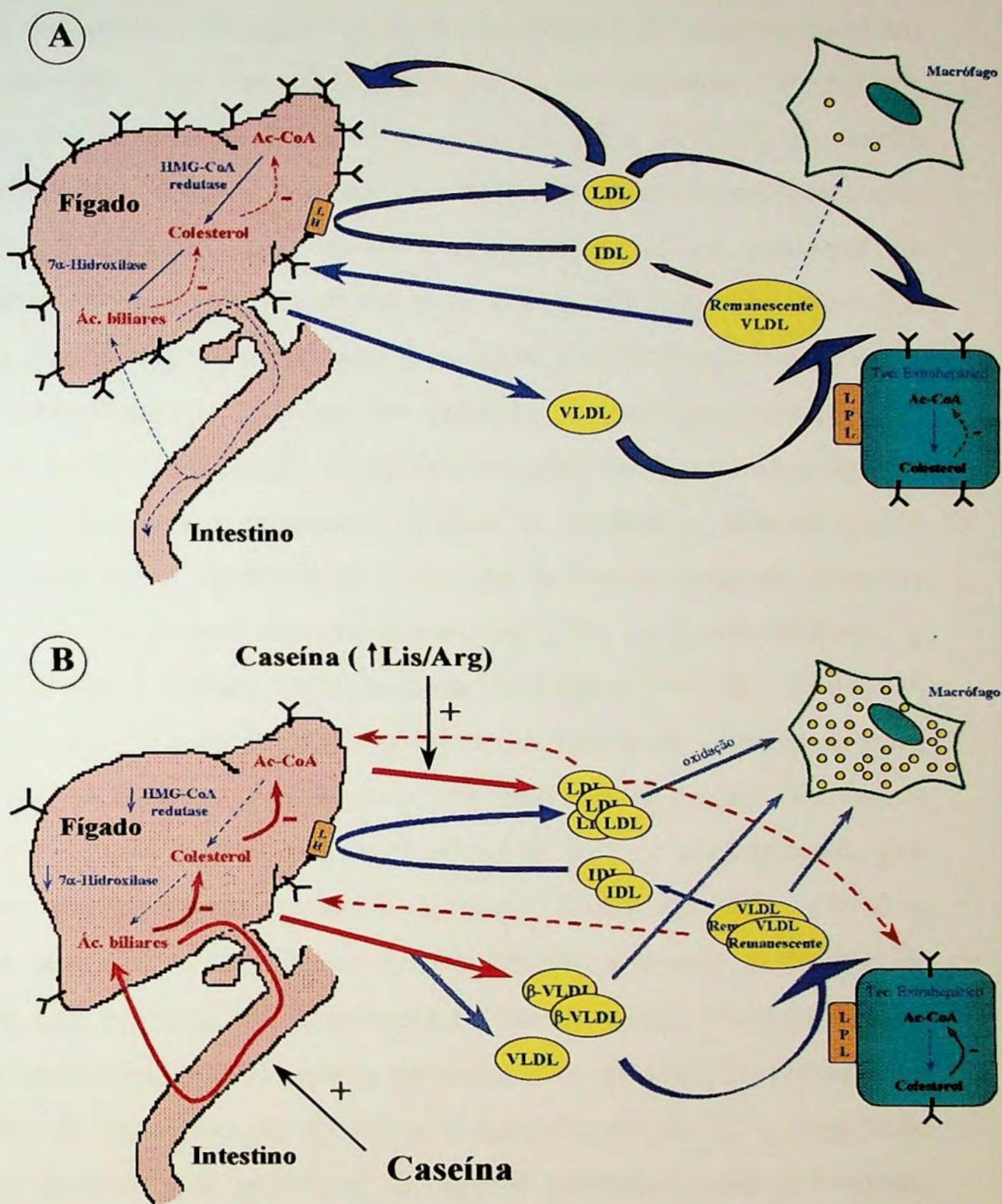


Figura 2 - Mecanismo de ação hipercolesterolêmica da caseína. Y- receptor da LDL, LPL - lipase lipoprotéica, LpH - lipase hepática. A - Metabolismo normal da VLDL e LDL em coelhos: fígado e tecidos extrahepáticos obtêm a maior parte de seu colesterol através da captação da LDL mediada pelo receptor Y. B - Ação da caseína sobre o metabolismo da VLDL e LDL em coelhos: o aumento da reabsorção de colesterol provoca a inibição das enzimas 7 α -hidroxilase e HMG-CoA reductase, hiporegulação dos receptores Y e aumento da síntese de LDL independente de VLDL, levando a um acúmulo de β -VLDL, IDL e LDL que são captados por macrófagos formando "foam cells".

O mecanismo da ação hipercolesterolêmica da caseína também pode envolver uma resposta hormonal a aminoácidos específicos (Nagata *et al.*, 1982). De acordo com Pfeuffer (1989), o padrão metabólico causado pela caseína se assemelha ao do hipotireoidismo. Animais alimentados com caseína apresentam níveis elevados de insulina no sangue, relacionados a uma inibição da resposta tecidual à insulina (Vanhouny *et al.*, 1985). A suplementação dessa dieta com L-arginina resultou em redução dos lipídeos plasmáticos, redução dos níveis de insulina e elevação da atividade hepática da 7 α -hidroxilase. A L-arginina aumenta a resposta tecidual à insulina e sabe-se que a insulina estimula a atividade da HMG-CoA redutase, podendo reverter a inibição dos receptores hepáticos da LDL e, possivelmente, a hiperlipidemia induzida pela caseína (Giugliano *et al.*, 1997). A hiporregulação dos receptores hepáticos da LDL pode contribuir para uma elevação da LDL induzida pelos aminoácidos essenciais (Kurowska & Carrol, 1992 e 1994). Em coelhos, parte da LDL é sintetizada por uma via independente da VLDL (Ghiselli, 1982; La Ville, 1984) e existem algumas evidências de que a caseína estimule a síntese *de novo* de LDL por essa via (Kurowska & Carrol, 1992). Dietas ricas em lisina e metionina (como ocorre na dieta com caseína) provocam um aumento da incorporação de lisina à apoproteína da LDL, sugerindo que um aumento da produção de apo B contribui para a resposta hipercolesterolêmica induzida pela caseína (Kurowska e Carroll, 1996) juntamente com a reduzida eficiência de remoção da LDL.

Em contraste, a proteína da soja e seus derivados têm apresentado ação hipocolesterolêmica e anti-aterogênica, tanto em animais (Chait *et al.*, 1993) quanto em humanos (Anderson *et al.*, 1995). Anderson *et al.* (1995) verificaram uma redução de 13 % do

colesterol da LDL e um aumento de 2% do colesterol da HDL em pessoas que consumiram proteína da soja. Este efeito benéfico da proteína da soja nas concentrações de lipoproteínas plasmáticas culminou recentemente na recomendação pela "U.S. Food and Drug Administration", afirmando que "25 g de proteína da soja por dia, como parte de uma dieta com baixos teores de gordura saturada e colesterol, pode reduzir o risco de doenças cardíacas." A proteína da soja possui uma elevada razão arginina/lisina; entretanto, dietas com uma mistura de aminoácidos correspondente aos da proteína da soja resultam em níveis de colesterol plasmático maiores que aqueles obtidos com a proteína da soja intacta (Huff *et al.*, 1977), sugerindo que o efeito protetor desta proteína deve estar relacionado a outros fatores, além da sua constituição de aminoácidos.

Existem fortes evidências de que estas ações não se devam exclusivamente a um componente isolado, ou seja, a proteína da soja, mas poderiam ser promovidas, ou potencializadas, pela presença de outras substâncias associadas a ela. Apesar destas observações, os mecanismos precisos através dos quais a soja e/ou seus componentes atuam reduzindo as concentrações de colesterol, a oxidação de lipoproteínas e a formação de lesões ateroscleróticas ainda não são bem compreendidos. Alguns estudos sugerem que a ação protetora da soja esteja associada à redução da absorção de lipídeos (Beynen *et al.*, 1986), à redução da circulação êntero-hepática de colesterol e sais biliares, associada à elevada excreção fecal de sais biliares (Sugano *et al.*, 1982; Roberts, 1981), ao aumento na transferência de apoproteínas E e C da VLDL para a HDL (Roberts, 1981), à redução das concentrações séricas de colesterol e triacilglicérides (Antony *et al.*, 1997), ao aumento do transporte reverso de colesterol (Beynen *et*

al., 1986), ao aumento da atividade do receptor da LDL (Potter, 1996), à menor oxidação de lipoproteínas (Kerry e Abbey, 1998), à redução dos níveis circulantes de insulina (Fajans *et al.*, 1968) e ao aumento da sensibilidade tecidual à insulina (Anderson, 1982). Estes estudos utilizaram a soja sob diferentes formas e todos verificaram que é eficiente na redução da hipercolesterolemia e/ou no desenvolvimento da aterosclerose. Apesar destes resultados, até o momento ainda não se sabe especificamente qual(is) o(s) componente(s) da soja estão efetivamente envolvidos nos mecanismos de proteção descritos acima. Estudos recentes têm demonstrado que a proteína isolada da soja, as fibras, as saponinas (Rao e Sung, 1995), o ácido fítico (Sharma, 1980), os inibidores de tripsina (Anderson e Woulf, 1995) e as isoflavonas (Fuhrman *et al.*, 1997) exercem, de forma dose-dependente, algum tipo de ação protetora contra as hiperlipidemias e o desenvolvimento da aterosclerose. A proteína e as saponinas da soja podem ser responsáveis pelo seus efeitos intestinais, enquanto as isoflavonas podem estar envolvidas na regulação da atividade do receptor da LDL (Potter *et al.*, 1998). Em adição, um aumento na secreção de ácidos biliares pode diminuir as reservas de colesterol hepático e aumentar a atividade do receptor hepático da LDL. Ver figura 4.

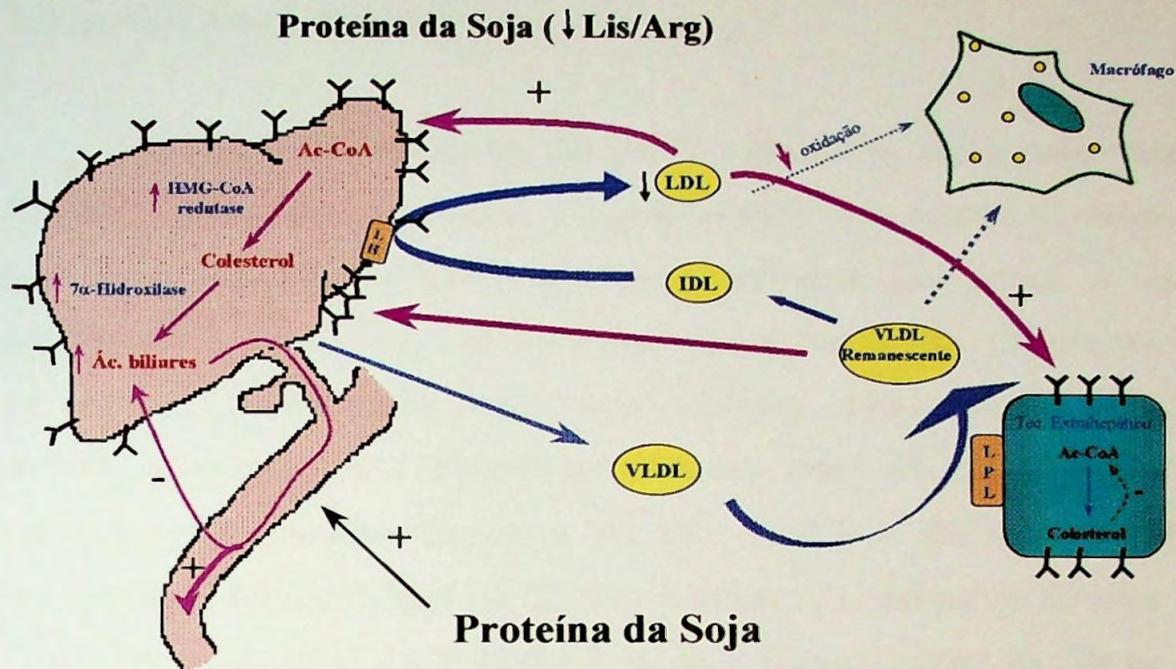


Figura 4 - Mecanismos hipocolesterolêmicos da proteína da soja. Y-receptor da LDL, LPL - lipase lipoprotéica, LH - lipase hepática. Ação da proteína da soja sobre a hipercolesterolemia: diminuição da reabsorção e aumento da excreção de colesterol e ácidos biliares no intestino, aumento da atividade das enzimas 7α -hidrolase e HMG CoA-redutase, hiper-regulação os receptores Y e diminuição da oxidação da LDL e consequente captação por macrófagos.

1.4. Isoflavonas e Aterosclerose

As isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína, assim como suas formas glicosiladas, acetiladas e complexadas aos resíduos malonil (genistina, daidzina e glicitina), formonnetina e biocianina A são consideradas substâncias potencialmente antioxidantes (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997), com ação estrogênica (Murphy, 1982; Santell *et al.*, 1997), inibidoras de crescimento tumoral (Wei *et al.*, 1993), da agregação plaquetária (Furman *et al.*, 1994) e da secreção de serotonina (Nakashima *et al.*, 1991). Portanto, o consumo da soja e seus derivados, além de contribuir para o fornecimento de fibras e proteínas, associadas à redução da hipercolesterolemia e ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, apresenta um *pool* de isoflavonas capaz de potencializar o efeito isolado destes nutrientes.

As isoflavonas são amplamente encontradas em vegetais, tais como frutas e grãos, sendo a soja uma das principais fontes alimentares, pois apresenta estes compostos em concentrações elevadas. Fukutake *et al.* (1996) compararam o consumo de soja e seus derivados nas populações japonesa e americana e o correlacionaram à incidência de algumas patologias. Esses autores verificaram que a incidência de doenças cardiovasculares, câncer de próstata, de mama e de cólon, assim como osteoporose, apresenta relação negativa com o consumo de isoflavonas na população japonesa.

Anthony *et al.* (1997), visando comprovar a ação das isoflavonas no desenvolvimento da aterosclerose, alimentou macacas com dieta rica em proteína isolada da soja contendo ou não isoflavonas. Os resultados obtidos demonstraram que a presença das

isoflavonas promoveu uma ação preventiva estatisticamente superior àquela detectada no grupo que não consumiu isoflavonas. Este efeito pode ser mediado pelo aumento da atividade do receptor da LDL (Kirk *et al.*, 1998). Concentrações aumentadas de isoflavonas em sistemas *in vitro*, em particular genisteína, inibe a adesividade celular, altera a atividade de fatores de crescimento, e inibe a migração e proliferação de células musculares lisas envolvidas na formação da lesão aterosclerótica (Mäkela *et al.*, 1999; Raines e Ross, 1995). Dentre as isoflavonas, a genisteína vem demonstrando ter o maior potencial antioxidante, quando comparada às outras, sendo aproximadamente 3 vezes maior que o Trolox ou vitamina C (Ruiz-Larrea, 1997).

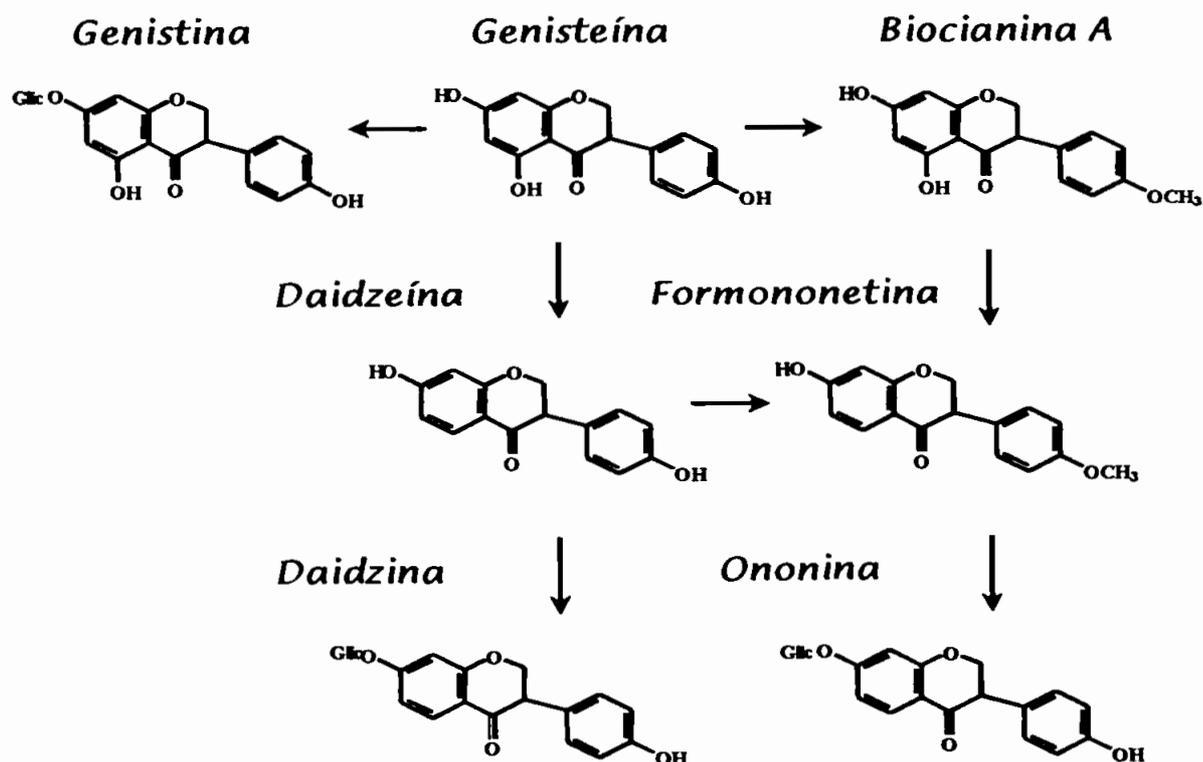


Figura 5 - Estrutura química de algumas isoflavonas

O potencial biológico das isoflavonas varia com a estrutura química. As alterações da estrutura 5,7-dihidroxi no anel A do grupo monofenólico afetam dramaticamente a atividade antioxidante da genisteína, sendo que a sequência de eficácia antioxidante é a seguinte: genisteína > genistina > biocianina A > daidzeína (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997). Tikkanen *et al.* (1998) estudaram o efeito da ingestão de proteína isolada da soja contendo 60 mg de isoflavonas por dia na oxidação da LDL em um grupo de seis voluntários saudáveis. Após duas semanas de consumo da soja verificou-se um aumento de 20 min na *lag phase* da oxidação da LDL. Um outro estudo também verificou um aumento de 9,9 % no *lag time* de oxidação da LDL humana após suplementação com proteína da soja contendo 60-70 mg de isoflavonas (Scheiber *et al.*, 2000). Um outro estudo comparou a *lag phase* da oxidação da LDL isolada de pessoas que consumiram tofu e carne e também verificaram uma aumento da *lag phase* para os que consumiram tofu, além de significativa diminuição de colesterol e triglicerídeos totais (Ashton *et al.*, 2000). Estes estudos mostram que um dos mecanismos pelos quais as isoflavonas exercem seus efeitos antiaterogênicos é através de sua capacidade antioxidante.

As isoflavonas são também chamadas fitoestrógenos por possuírem leve efeito estrogênico (Duncan *et al.*, 1999; Antony *et al.*, 1996). Isoflavonas que possuem um grupo 4'-hidroxil (genisteína e daidzeína) são mais potentes agentes uterotrópicos que seus 4-metil ésteres (biocianina A e formonetina, respectivamente) (Bickoff *et al.*, 1962) (Figura 5). A proteína isolada da soja, contendo isoflavonas, tem demonstrado um efeito na diminuição da pressão diastólica sanguínea em mulheres. Em um estudo que utilizou 51 mulheres na

perimenopausa, 20 g de proteína isolada da soja (contendo 34 mg de isoflavonas) foi uma dose significativamente suficiente para reduzir a pressão diastólica em 5 mm Hg (Washburn *et al.*, 1999). Em um outro estudo (Crouse *et al.*, 1999), no qual homens e mulheres moderadamente hipercolesterolêmicos foram suplementados com 25 g de caseína ou de proteína isolada da soja com diferentes concentrações de isoflavonas (3 a 62 mg de isoflavonas por 25 mg de proteína), houve uma significativa tendência para diminuição da pressão diastólica com o aumento da dose de isoflavonas nas mulheres. Nenhum efeito foi observado em homens. Um outro resultado deste estudo foi que houve um efeito benéfico dose-dependente sobre as lipoproteínas plasmáticas.

Uma outra importante ação das isoflavonas da soja sobre as doenças cardiovasculares é a inibição da agregação plaquetária. Williams e Clarkson (1998) verificaram uma maior redução do fluxo sanguíneo após ativação de plaquetas induzida por colágeno em primatas fêmeas não-humanas que consumiram proteína da soja sem isoflavonas, comparado com outras que consumiram proteína da soja com isoflavonas. Quando plaquetas são ativadas, ocorre a liberação de substâncias vasoativas, incluindo serotonina que é um potente vasoconstritor. As isoflavonas inibem a agregação e ativação plaquetária e reduzem a liberação de serotonina das plaquetas, contribuindo assim para a redução no vasospasmo e trombose.

Esses efeitos na vasodilatação parecem estar relacionados ao potencial estrogênico das isoflavonas. As isoflavonas exercem um modesto efeito agonista no receptor β estrogênico (aproximadamente um terço da potência do estradiol) e um efeito leve no receptor α estrogênico (razão de 0,001 da potencia do estradiol) (Kuiper *et al.*,

1998). Isoflavonas da soja aumentam a resposta dilatadora à acetilcolina em artérias ateroscleróticas de macacas (Honoré *et al.*, 1997).

As isoflavonas podem retardar o desenvolvimento da formação da placa aterosclerótica por inibir a adesão celular e alterar a atividade de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas e citocinas que influenciam a formação da lesão. Estes efeitos são mediados pela inibição da proteína tirosina quinase (Raines *et al.*, 1995). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a inibição das vias de transdução de sinal, associadas às proteínas tirosina quinases, inibe a expressão da enzima óxido nítrico sintase e, conseqüentemente, a síntese de óxido nítrico (Redegeld *et al.*, 1997). Genisteína é um potente inibidor da proteína tirosina quinase (Sargeant *et al.*, 1993), bloqueando a produção de óxido nítrico em cultura de células (Orlicek *et al.*, 1996), inibindo a indução de iNOS por lipopolissacarídeos (LPS) (Ruetten & Thiemermann, 1997; Ruetten *et al.*, 1999) e a expressão de proteínas de choque térmico (Buckley *et al.*, 1993; Zhou e Lee, 1998). A genisteína inibe o efeito estimulador da LDL oxidada sobre a fosforilação de tirosina em células endoteliais aórticas de coelhos (Fries *et al.*, 1995) e a fosforilação de algumas proteínas (Kapiotis *et al.*, 1997). A genisteína, mas não a daidzeína, preveniu a falência circulatória, a disfunção múltipla de órgãos causada por endotoxina em ratos e a indução de iNOS e cicloxigenase-2 (Ruetten & Thiermann, 1997). A biocianina A também parece inibir a NOS e a produção de óxido nítrico (Hsu *et al.*, 2000). Portanto, é possível que a administração de isoflavonas, *in vivo*, possa modular a síntese de óxido nítrico.

Considerando que: 1) a produção elevada de óxido nítrico estimula a expressão das proteínas de choque térmico, 2) no estágio inicial da aterosclerose há uma reação auto-imune contra estas proteínas e que 3) a expressão destas proteínas pode ser modificada pela presença de genisteína, através da inibição da síntese de óxido nítrico, poder-se-ia considerar que esta isoflavona poderia atuar em diversas vias de transdução de sinal, modulando a produção de óxido nítrico, das proteínas de choque térmico e a resposta auto-imune associada a estas proteínas, o que influenciaria o desenvolvimento da aterosclerose.

Atualmente, os estudos *in vitro*, envolvendo a ação das isoflavonas sobre diferentes processos patológicos, utilizam substâncias purificadas obtidas através de técnicas de elevado custo. Portanto, o desenvolvimento de estudos *in vivo* baseados nestas substâncias torna-se economicamente inviável e impossível de ser extrapolado à população. Baseando-se nestas informações, nos propusemos utilizar um sub-produto da soja, obtido durante a purificação da proteína isolada da soja e, atualmente, sem valor comercial, como fonte das isoflavonas. Este produto, denominado molassa apresenta aproximadamente 34,6% de carboidratos, 3,2% de proteína, 3,1% de gordura, 4,2% de minerais e aproximadamente 2 g/L de isoflavonas e representa uma das maiores fontes de isoflavonas derivadas da soja. A utilização deste produto não só apresenta vantagens econômicas, mas representa uma nova perspectiva para a indústria alimentícia e/ou farmacêutica, caso os resultados obtidos demonstrarem, à princípio em animais e posteriormente em humanos, os benefícios do consumo das isoflavonas na prevenção e/ou no tratamento da aterosclerose.

Portanto, baseando-se nos estudos que sugeriram a existência da relação genisteína → óxido nítrico → proteínas de choque térmico, propomos investigar o efeito das isoflavonas da soja na produção de óxido nítrico e das proteínas de choque térmico *in vivo* e a relação destes fatores com a progressão da aterosclerose.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é investigar a influência das isoflavonas da soja na hipercolesterolemia, na produção de óxido nítrico, na síntese das proteínas de choque térmico, na formação de auto-anticorpos anti-proteínas de choque térmico e na formação de lesões ateroscleróticas em coelhos alimentados com uma dieta aterogênica contendo caseína.

2.1. Objetivos Específicos

Visando atingir o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos são propostos:

1. Padronizar um método de extração e purificação de isoflavonas da molassa da soja.
2. Determinar a atividade antioxidante do extrato de isoflavonas.
3. Determinar as concentrações de isoflavonas no plasma e na urina dos animais.
4. Determinar as concentrações de colesterol, triacilgliceróis e proteínas totais no plasma e nas frações lipoprotéicas (VLDL, LDL e HDL) obtidas dos animais.

5. Determinar a formação de óxido nítrico, através da análise de nitrato no plasma e em homogenato do arco aórtico dos coelhos.
 6. Determinar a presença da enzima NOSi, de nitrotirosina e das proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70 e HSC70) no arco aórtico contendo lesões ateroscleróticas, por imunohistoquímica.
 7. Determinar a presença de autoanticorpos anti-proteínas de choque térmico no soro e na aorta contendo lesões ateroscleróticas.
 8. Realizar a análise morfométrica das lesões ateroscleróticas (distribuição, área e volume).
-

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho Experimental

GRUPO	COELHOS	MODELO EXPERIMENTAL	TEMPO
CAS	5	Dieta aterogênica (DA)	6 meses
ISO	5	DA + isoflavonas	6 meses

3.2. Animais

Os animais utilizados nesse estudo foram coelhos machos da raça *New Zealand*, adquiridos da Procria S/A., Suzano, São Paulo. Foram utilizados animais recém-desmamados com idade de 45 dias e peso variando de 1,2 a 1,5 Kg, que passaram por um período de adaptação, que consistiu em 3 dias alimentados com ração comercial comum para coelho (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo-Paraná), 2 dias alimentados com uma mistura de 25% da ração experimental e 75% da ração comercial, 2 dias alimentados com uma mistura de 50% de cada ração e 2 dias alimentados com uma mistura de 75% da ração experimental e 25% da ração comercial e, enfim, os animais foram alimentados com a ração experimental integralmente até o final do período experimental de 6 meses. Os animais foram mantidos em gaiolas separadas, sob o ciclo de luz de 12 horas e temperatura controlada (25 °C).

3.3. Modelo Dietético

A composição da dieta aterogênica foi feita de acordo com Roberts et al, 1981 e é apresentada na tabela 1. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os ingredientes, após serem preparados de acordo com suas características de solubilidade, foram homogeneizados em misturador industrial. Em seguida, o produto resultante foi hidratado e peletizado de modo que as rações tivessem a mesma forma e fossem adequadas ao consumo dos animais. As rações foram secas em estufa com ventilação a 60°C por 12 horas. As rações foram mantidas a 4°C para minimizar a oxidação. As isoflavonas adicionadas à ração foram obtidas de acordo com o item 3.4.1.

De acordo com Carrol e Kurowska (1995), a ingestão diária de 31 a 47 g de proteína da soja é suficiente para a redução dos níveis de colesterol total e da LDL humana. Sabendo-se que 100 g de proteína da soja contém de 115 a 147 mg de isoflavonas (Eldridge *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 1996), concluímos que a ingestão de 50 mg de isoflavonas ao dia seria suficiente para a redução dos níveis de colesterol em humanos. Considerando este consumo (50 mg) para um indivíduo de 70 Kg, a dose diária de isoflavonas por kilo de peso corporal é de 0,71 mg/dia. Utilizamos nos animais, uma dose 7 vezes maior que essa (5,1mg/dia/Kg). Essa dose foi incorporada à ração, ajustada ao consumo médio e ao peso dos animais mensalmente.

Tabela 1 - Composição Nutricional da Dieta Aterogênica

Mistura Salínica

Produto	g/Kg/mist.
Cloreto de cobalto.6 H ₂ O	0,05
Sulfato de cobre. 5 H ₂ O	30
Sulfato de manganês. H ₂ O	5,1
Cloreto de zinco	0,025
Citrato férrico (16-17%)	27,5
Cloreto de sódio	167
Carbonato de cálcio	300
Fosfato de cálcio monobásico	75
Sulfato de magnésio	102
Iodeto de potássio	0,8
Fosfato de potássio dibásico	322

Mistura vitamínica

Produto	mg/Kg de dieta
Acetato de retinil	6,88
cianocobalamina	0,02
Acetato de α -tocoferol	55
Vitamina K3 (menadiona)	30
Hidrocloreto de piridoxina	7,5
Hidrocloreto de tiamina	7,5
Pantotenato de cálcio	88,5
Biotina	0,3
Ácido fólico	0,75
Ácido Nicotínico	75
Cloreto de colina	1500
Inositol	150
Riboflavina	15

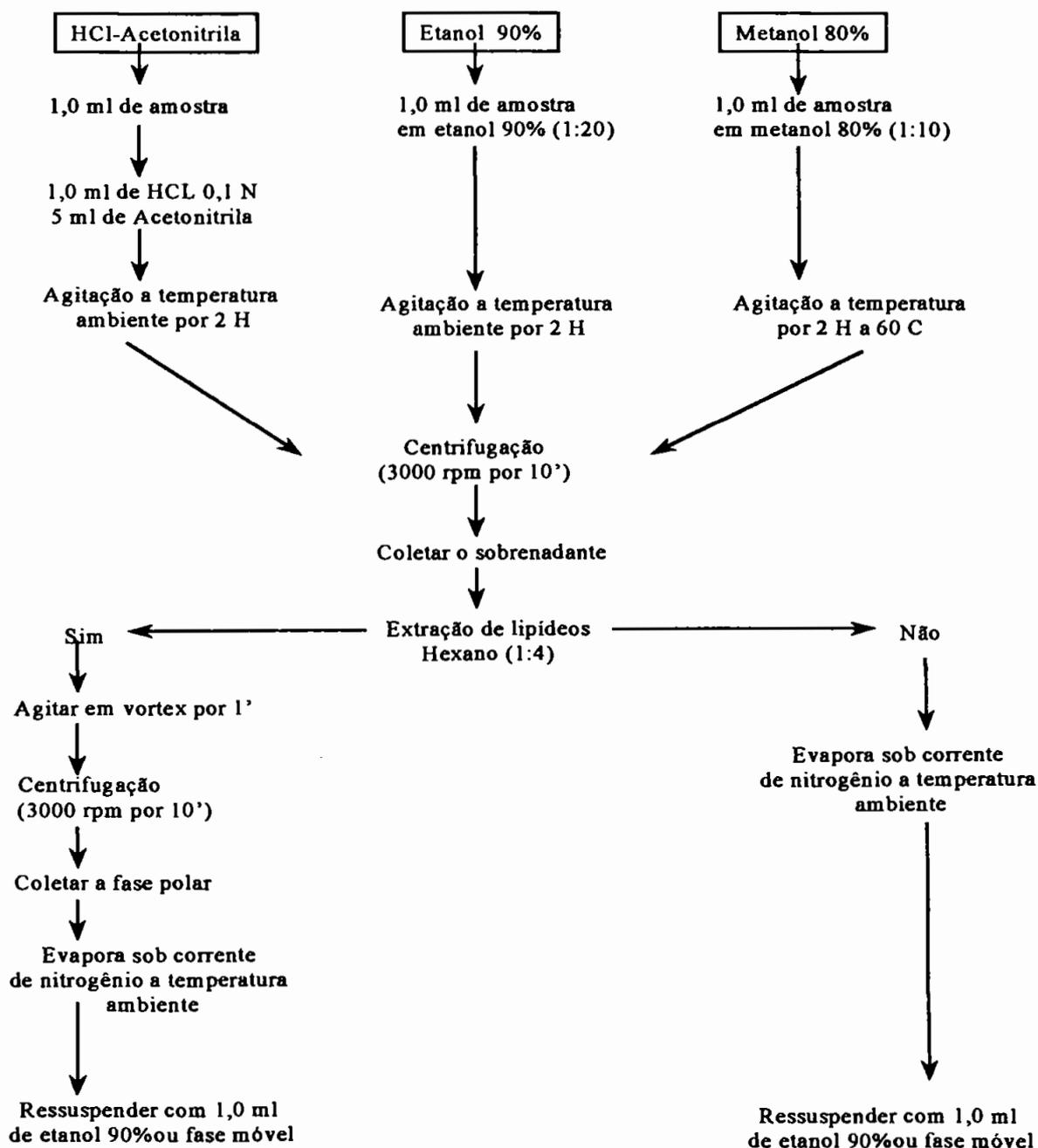
Composição final da dieta

Caseína.....	27,0 %
mistura salínica.....	4,0 %
mistura vitamínica.....	1,5 %
dextrose.....	58,5 %
óleo de milho.....	1,0 %
celulose.....	5,0 %
xarope de milho (50% v/v).....	30,0 %

3.4. Extração de Isoflavonas

3.4.1. Molassa

Protocolo de Extração de Isoflavonas da Molassa em Escala Laboratorial



Após ser escolhido o protocolo do etanol 90%, devido ao maior rendimento obtido para as isoflavonas, a extração em escala semi-industrial foi feita como se segue. As isoflavonas da molassa foram extraídas em etanol 90% nas proporções de 1:20, 1:10, 1:5, 1:3 e 1:2 (v/v) (volume final de 1L), com e sem aquecimento (40 °C), sob agitação constante por 2 horas. A extração na proporção de 1:5, sem aquecimento, demonstrou ser a mais adequada e nestas proporções foram extraídos 25 L de molassa (volume final de 125 L). Em seguida, a mistura foi decantada, sendo o sobrenadante concentrado num sistema de destilação à vácuo com capacidade de 10 L, a 40 °C.

O produto concentrado livre de etanol foi passado através de uma coluna para extração em fase sólida C18 (Bondesil Sorbents, Varian) com um volume de 1,2 L, massa adsorvente de 1Kg e capacidade de retenção de aproximadamente 10 g de substâncias apolares (fig 4). Em cada extração, foi aplicado na coluna um volume correspondente a aproximadamente 1g de isoflavonas. A coluna foi lavada com água gelada (5 L) e as isoflavonas foram eluídas em etanol 90% (5 L). O extrato purificado foi reconcentrado em rotaevaporador a 40 °C. Este extrato purificado concentrado foi adicionado na formulação da ração de forma que os animais consumissem aproximadamente 5,1 mg de isoflavonas/Kg/dia. O conteúdo de isoflavonas foi detectado por HPLC. O residual de etanol presente nesse extrato foi evaporado durante a secagem da ração.

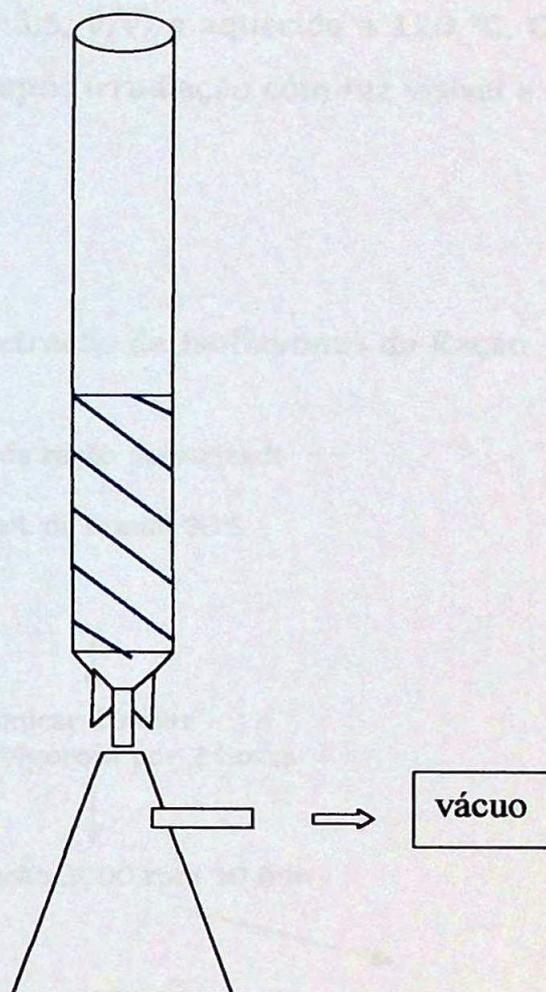


Figura 6 - Representação da extração em fase sólida utilizada para purificação de isoflavonas

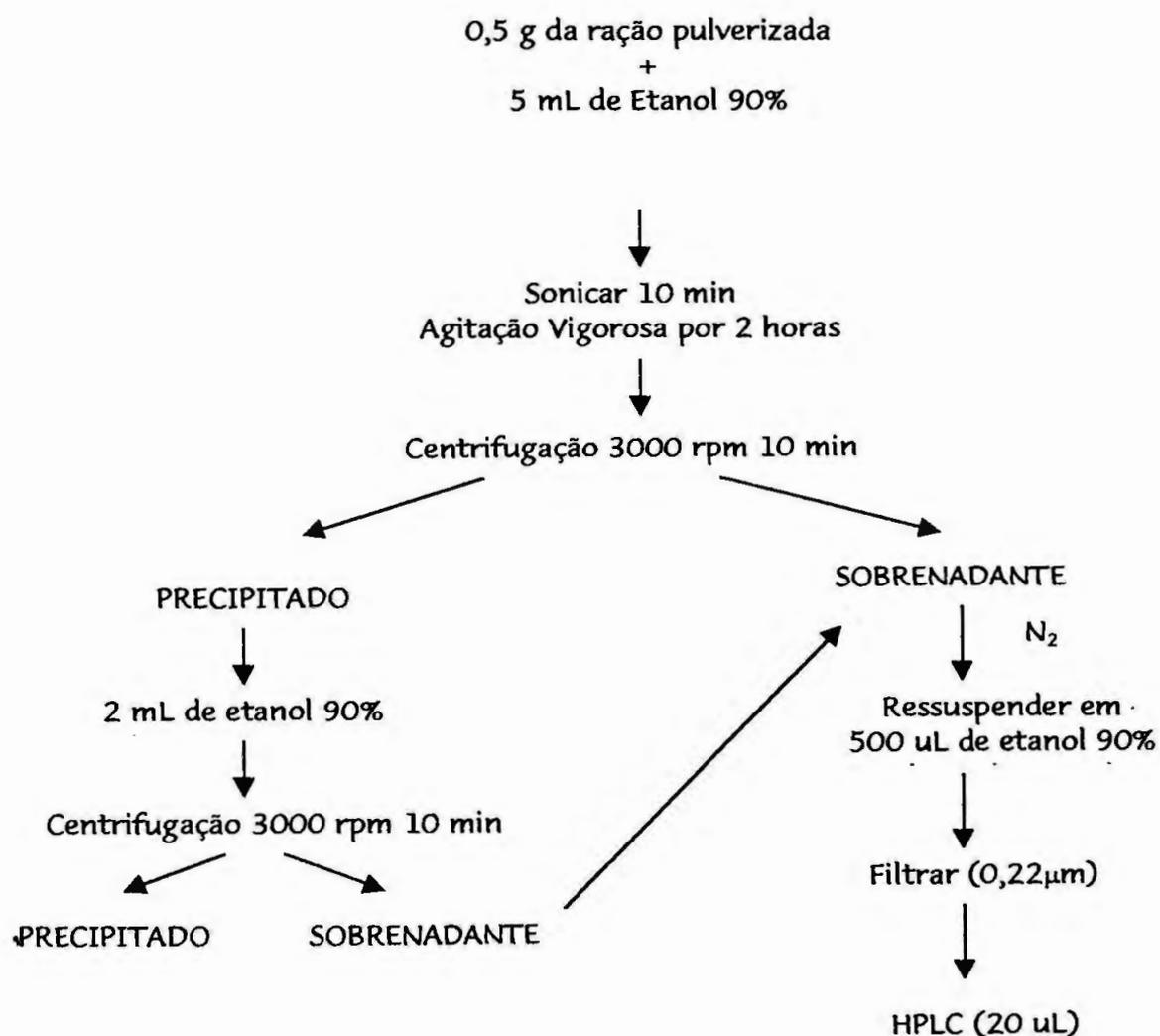
3.4.1.1. Determinação de Saponinas

Para verificar uma possível contaminação do extrato purificado por saponinas, o extrato aplicado na coluna; a água de lavagem e o extrato purificado foram submetidos a uma cromatografia em camada delgada, para determinação de saponinas. A análise foi feita em placas de sílica-gel de 500 μm e desenvolvida com clorofórmio/metanol/água

(65:50:10, v/v). A placa foi pulverizada com metanol/anidrido acético/ácido sulfúrico (50:5:5, v/v) e aquecida a 120 °C. Observou-se o desenvolvimento de cor, após irradiação com luz visível e UV.

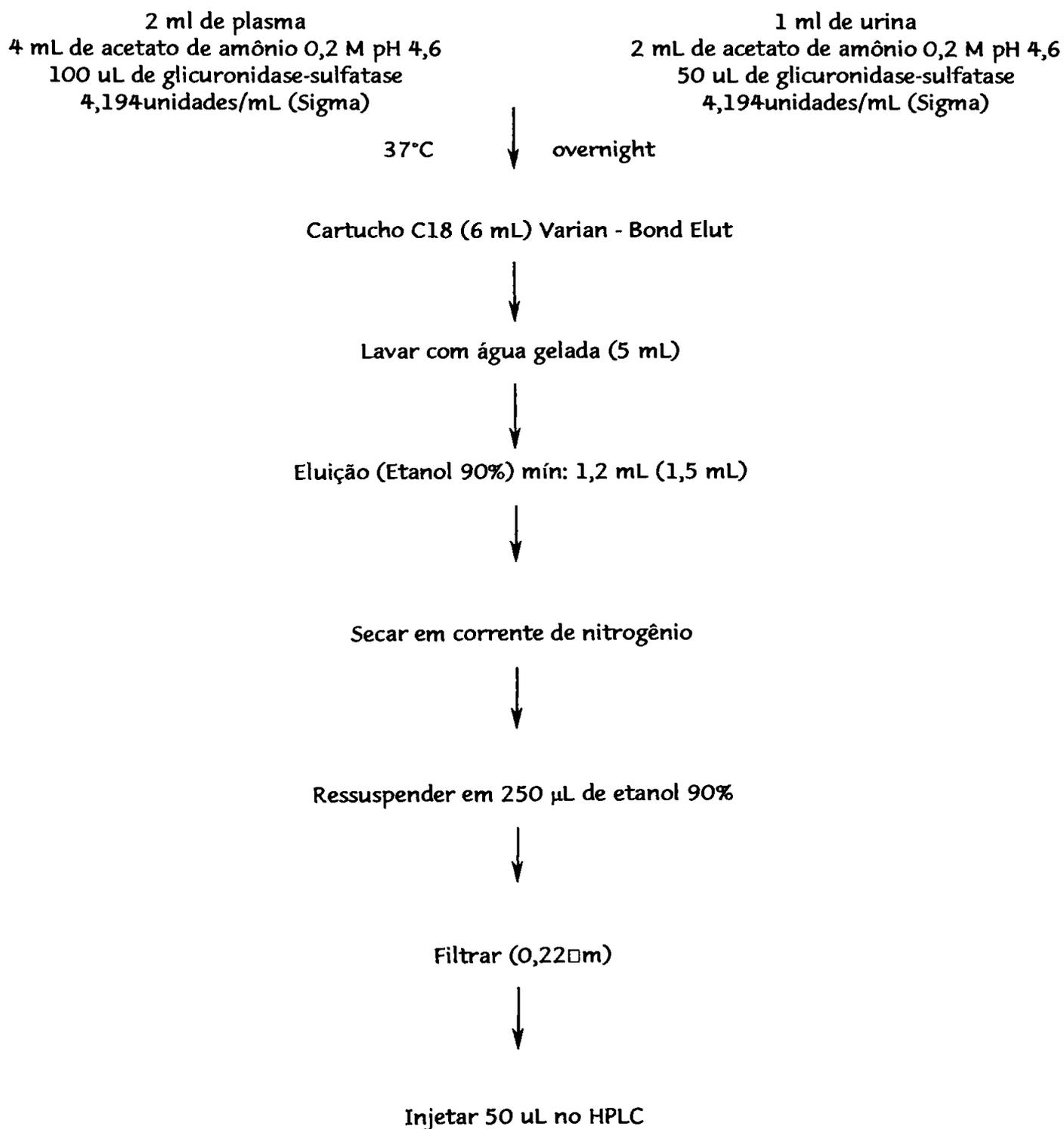
3.4.2. Ração

Protocolo de Extração de Isoflavonas da Ração



3.4.3. Plasma e Urina

Protocolo de Extração de Isoflavonas do Plasma e da Urina



3.5. Determinação de Isoflavonas

Condições Cromatográficas:

Todas as análises de isoflavonas foram realizadas por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), utilizando-se uma coluna de fase reversa Hypersil ODS 5 μ m (250 x 4,6 mm) Supelco. Fluxo: 0,8 mL/min. Gradiente Linear: A, ácido acético em água (10:90, vol); B, metanol-acetonitrila-diclorometano (10:5:1, vol); B em A (em vol) a 5% por 5 min, de 5% a 45% em 5 min, de 45% a 70% em 6 min e de 70% a 5% em 3 min (Franke *et al.*, 1998). A absorção das isoflavonas foi monitorada em 262 nm e do equol em 280 nm.

Padrões externos de genisteína, genistina, daidzeína, daidzina, formonnetina, biocianina A, prunetina e equol foram adquiridos da Endofine Chemical Co., USA. A partir dos padrões externos foram feitas curvas de calibração, utilizadas para a quantificação das diferentes isoflavonas presentes na molassa, no plasma, na urina e na ração.

3.6. Purificação de Lipoproteínas

Nos períodos basal, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses foram coletadas amostras de sangue dos animais, após um jejum prévio de 12-15 horas. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA (1mg/ml), como anticoagulante e antioxidante, mantido em gelo e protegido da luz até a obtenção do plasma. Ao plasma foram acrescentados os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (2 μ g/ml), benzamidina (2mM) e PMSF (1mM), além do antioxidante BHT (20mM). A partir do

plasma, a lipoproteína de muito baixa densidade - VLDL ($1,006 < d < 1,019$), a lipoproteína de baixa densidade - LDL ($1,020 < d < 1,063$) e a lipoproteína de alta densidade - HDL ($1,065 < d < 1,210$) foram isoladas por ultracentrifugação seqüencial (38.000 rpm, 24 horas, a 4°C). As lipoproteínas isoladas foram dialisadas contra 6 litros de tampão (150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10 mM de Tris) pH 7,4, durante 12 horas, a 4°C, e armazenadas em nitrogênio até o momento da análise.

3.7. Análises Lipídicas e de Proteína

As concentrações de colesterol e de triacilgliceróis no plasma e nas frações lipoprotéicas (VLDL, LDL e HDL) e o conteúdo de colesterol na aorta (extraído conforme item 3.10) foram determinadas através de métodos enzimáticos, utilizando-se reagentes comerciais (BioSystems). Os resultados de colesterol e triglicerídeos das lipoproteínas foram ajustados aos resultados plasmáticos, sendo a recuperação para o colesterol, 75% e para triglicerídeos, 107%. As concentrações de proteína têm sido avaliadas de acordo com a metodologia estabelecida por Lowry *et al.* (1951), utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão.

3.8. Análise Morfométrica

Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados e, em seguida, sacrificados. As aortas dissecadas foram utilizadas na análise macroscópica e microscópica da distribuição das lesões. Um segmento da região de maior incidência das lesões, comum a todos os

animais foi embebido em TissueTec e congelado em isopentano. As amostras foram transferidas para blocos de parafina e foram feitos cortes transversais seriados com espessura de 5 μm que foram corados com hematoxilina-eosina e utilizados para a análise morfológica da área e do volume das lesões. A análise foi realizada através do sistema *Image ProPlus* de análise de imagens. Essa análise foi realizada em uma amostragem de 6 cortes por aorta. Estas análises são feitas em um microscópio acoplado a um computador com um analisador de imagens. A análise de área de lesões é feita medindo-se a superfície do corte da aorta ocupada por lesões (μm) e multiplicando-se esse valor por 5 μm (espessura do corte), obtendo-se um resultado em μm^2 e relacionando esse resultado com a área total do corte. A análise do volume de lesão é similar. Para a obtenção do volume, calcula-se a área ocupada por lesões (μm^2) no corte e multiplica-se esse resultado pela espessura do corte (5 μm), obtendo-se um resultado em μm^3 . Esse valor é relacionado ao volume total do corte. Ambos os resultados são expressos em percentual (%).

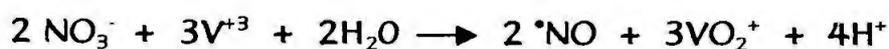
3.9. Extração realizada na Aorta para Determinação de Colesterol e Nitrato

100 mg de tecido (arco aórtico) foram homogeneizados em 1 mL de Tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 contendo 1 mM de EDTA, 15 mM de CHAPS (tensoativo), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinin, benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM e BHT 20 mM, em banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi usado para determinação de colesterol e nitrato.

3.10. Determinação de Nitrato

A concentração de nitrato no plasma e na aorta dos animais foi determinada pelo analisador de $\cdot\text{NO}$ (NOA^{TM280}, Sievers INC., USA). O plasma foi filtrado previamente em filtros Centrifree® (Millipore) a 1500 g por 30 minutos para separação das proteínas.

No NOA^{TM280}, o nitrato plasmático foi reduzido a $\cdot\text{NO}$ com vanádio (III) a 90°C, e o $\cdot\text{NO}$ formado foi detectado por quimiluminescência em fase gasosa, após reação com ozônio:



A intensidade da quimiluminescência é medida em mV e relacionada à de uma curva de calibração com concentrações de nitrato variando de 2 a 140 μM .

3.11. Imunohistoquímica

3.11.1. Preparação das amostras de aorta

Ao final do período experimental, amostras do arco aórtico dos animais foram embebidas em TissueTec, Leica®, congeladas em isopentano semi-congelado em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido. Foram feitos cortes de 5 μm e fixados em acetona. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, por 5 minutos. Efetuou-se o bloqueio das peroxidases endógenas com H_2O_2 30 volumes (100 ml de PBS + 1 ml de H_2O_2). Repetiu-se esta

etapa 3 vezes, sendo cada fase com duração de 5 minutos. Lavou-se 3 vezes com PBS.

.11.2. Detecção de Óxido Nítrico Sintase Indutível, Nitrotirosina e Proteínas de Choque Térmico na aorta

Após lavagem dos cortes, adicionou-se o anticorpo primário - anticorpo monoclonal anti-HSP60, HSP70 e HSC70 1:200 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC); anticorpo monoclonal anti-iNOS (Transduction Laboratories) e anti-nitrotirosina (Upstate Biotechnology) - 1:100, que foi incubado *overnight* à 37°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS. Foi adicionado o anticorpo secundário biotilado 1:500 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC) e incubado por 30 minutos à 37°C, em câmara úmida. Após lavar 3 vezes com PBS, foi adicionado o reagente terciário (Streptavidina conjugada com peroxidase) StressGen 1:500 e que ficou incubando por 1 hora à 37°C, em câmara úmida. Após 3 lavagens com PBS, a reação foi revelada com DAB (diaminobenzidina, Sigma) 0,4 mg/mL e peróxido de hidrogênio (Sinth, 6 uL/100 mL). As lâminas utilizadas para determinação de HSPs foram contracoradas com hematoxilina. O controle negativo foi feito na ausência do anticorpo primário.

3.12. Análise de Imagens

As imagens foram coletadas com um aumento de 20 vezes com um microscópio Axioplan acoplado a uma câmera de vídeo JVC TK128 OV, um computador, uma placa digitalizadora de imagens (Coreco

OCTX), um monitor de vídeo Sony Trinitron, utilizando o software Bioscan Optimas 4.10, Bioscan (Edmonds, WA).

Para determinar a densidade de imunoreatividade das HSP60, HSP70, e HSC70, iNOS e nitrotirosina foram feitas 5 leituras de cada corte, 3 cortes por coelho. As leituras foram feitas em regiões variadas do corte da aorta (sem delimitação de íntima, média e/ou adventícia). A média das medidas no nível de cinza (refletindo a densidade de imunoreatividade) foi expressa em uma escala linear de 0 (branco) a 255 (preto). As áreas coradas de cada imagem analisada, mostrando a reatividade, foram medidas e relacionadas à área total da imagem e expressas como percentual de área (%). As médias de imunoreatividade e as médias da área percentual de imunoreatividade foram estatisticamente comparadas usando o teste ANOVA.

3.13. Extração e Purificação de IgG da Aorta dos Coelhos

A extração de proteínas da aorta foi feita por homogeneização em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 contendo 0,32 M de sacarose na proporção de 1:10 (m/v), seguida de centrifugação a 1000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi conservado em gelo e o precipitado homogeneizado em tampão de extração (1:5) e novamente centrifugado. Os sobrenadantes foram reunidos e aplicados em uma coluna para dessalinização (Econo-Pac 10 DG, Bio-Rad). Foram coletadas frações de 1 mL, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro a 280 nm para determinar o pico de proteínas. O conteúdo dos tubos correspondentes ao pico foi aplicado em uma coluna para purificação de IgG (Econo-Pac, Bio-Rad). O eluato foi monitorado a 280 nm e as frações (1 mL) correspondentes ao pico de

absorção da fração IgG, foram concentradas em Speed Vac (SC 110, Savant) até o volume de 1 mL. Com esta fração realizou-se o ELISA para determinação de anticorpos anti-HSP60, HSP70 e HSC70.

3.14. Detecção de Autoanticorpos Anti-proteínas de Choque Térmico no Soro e na IgG Purificada da Aorta

A detecção de auto-anticorpos anti-proteínas de choque térmico foi realizada através do ensaio ELISA descrito por Xu *et al.* (1996), com as seguintes modificações:

1. Foram utilizadas placas de 96 poços (Costar). Os poços foram sensibilizados com 1 μ g/mL de HSP60, HSP70 ou HSC70 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC) em 100 μ L de PBS, pH 7,2 por poço a 4°C overnight e então lavados com PBS contendo 0,05% Tween 20. O bloqueio foi feito com leite desnatado 1% em PBS por 2 h a 4°C.
2. Foi feita a incubação à temperatura ambiente por 1 h com 100 μ L de soro diluído 1:10 a 1:10.000 em PBS contendo 0,1% de leite desnatado e então os poços foram lavados com PBS-Tween.
3. Em cada poço da placa adicionou-se 100 μ L de Imunoglobulina (IgG) anti-coelho conjugada com peroxidase (StressGen 1:2.000), diluída em PBS contendo 0,1% de leite desnatado, por 1 h a temperatura ambiente; após este tempo, realizaram-se 4 lavagens com PBS-Tween.

Para determinações em soro:

4. Ao final, foi adicionado 100 μ L de Tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,2, contendo 0,53 mg/mL de 2,2 azino-bis (ácido 3-

etilbenzotiazoline-6-sulfônico), e, em seguida, 0,025% de H₂O₂ 30 volumes.

5. A leitura foi feita depois de 30 min a 405 nm.

Os resultados foram expressos como o último título reativo (absorbância mínima de 0,2 acima do branco) multiplicado pela absorbância encontrada.

Para determinações na IgG purificada da aorta foram feitas algumas adaptações:

6. Foram utilizadas placas brancas (Nunc ®).

7. O bloqueio foi feito com leite a 5 % e as amostras foram diluídas 1:5 em leite 0,5 %.

8. Ao final, foi adicionado 100 µL de Luminol 2,3 mM, p-iodofenol 0,9 mM em tampão tris-HCl 0,1 M pH 8,5 e 25 µL de peróxido de hidrogênio 0,6 % em tampão tris-HCl 0,1 M pH 8,5

9. A contagem da luminescência emitida foi feita imediatamente 1 vez por minuto durante 10 minutos. A leitura de contagem mais alta foi usada para os resultados.

3.15. Análise Estatística

Os resultados foram calculados como média \pm desvio padrão. Para todas as variáveis correspondentes nas análises feitas em plasma ou soro, que foram coletados mensalmente, subtraiu-se os respectivos valores basais dos valores obtidos nos outros tempos, em cada coelho. Os grupos CAS e ISO foram comparados por análise de variância multivariada de medidas repetidas para se determinar o efeito da

dieta sobre as variáveis, durante o tempo em curso. Essa análise foi feita utilizando o programa SPSS/PC+ (Chicago, III). Também foi feita uma análise univariada para se comparar os valores de cada tempo com os valores basais, independente de grupo, os valores de dois grupos independente do tempo e os valores de área sob a curva entre os grupos, utilizando o método ANOVA e o programa ORIGIN 5.0. As correlações foram feitas utilizando-se o programa SigmaStat 1.0, método de Pearson Product Moment. " r^2 " = valor do coeficiente de correlação e " p " = nível descritivo. O valor de $P < 0,05$ foi usado como nível de significância em todas as análises estatísticas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da Extração de Isoflavonas da Molassa

4.1.1. Extração Laboratorial

As figuras 7 e 8 mostram a concentração das principais isoflavonas extraídas da molassa pelos três métodos escolhidos, em escala laboratorial. Dentre os métodos testados para a extração de isoflavonas da molassa, o que proporcionou um maior rendimento total foi aquele utilizando o etanol a 90%, além de que, mostrou um maior rendimento para a daidzeína. A figura 9 mostra a concentração total de isoflavonas extraídas por etanol 90% em diferentes proporções amostra/solvente, à temperatura ambiente e à 40 °C.

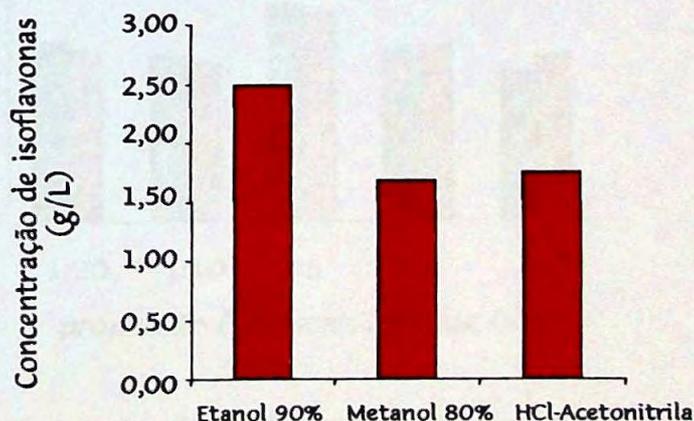


Figura 7 - Concentração de isoflavonas totais utilizando três métodos de extração.

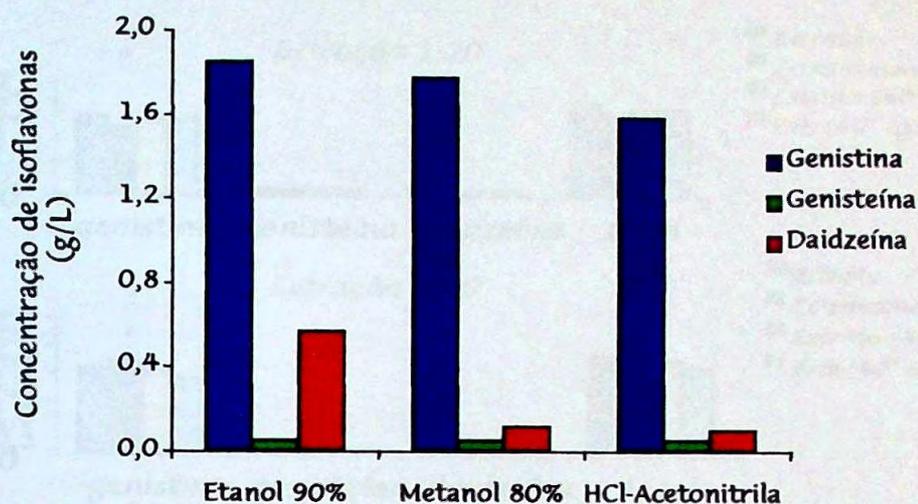


Figura 8 - Concentração das principais isoflavonas detectadas na molassa da soja por 3 diferentes métodos de extração

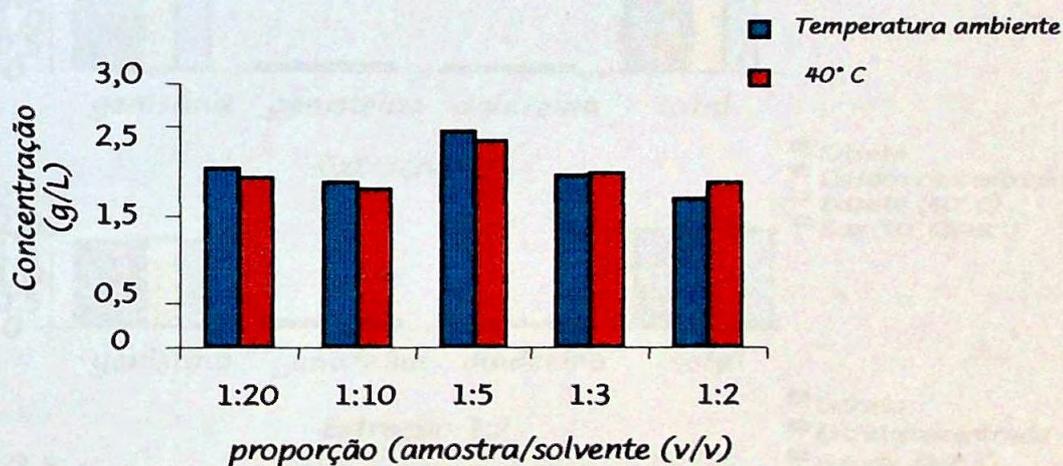


Figura 9 -Otimização da extração de isoflavonas utilizando etanol 90%

De acordo com a Figura 9, a extração das isoflavonas com etanol 90%, utilizando agitação mecânica vigorosa, foi mais eficiente na proporção de 1:5 (molassa/etanol, v/v).

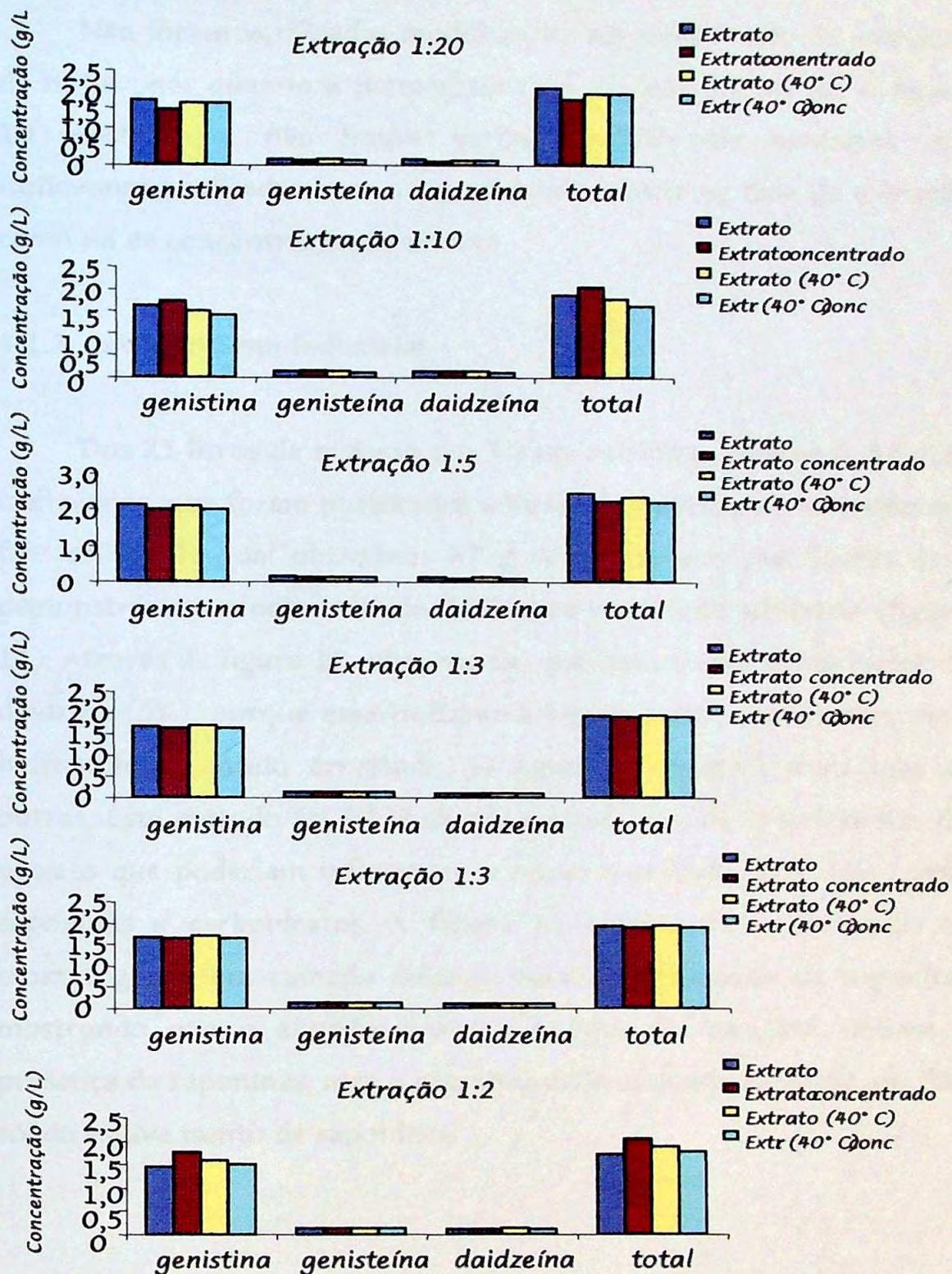


Figura 10 - Rendimento das extrações em diferentes proporções com e sem aquecimento, antes e após a concentração

Não foram verificadas modificações no rendimento da extração de isoflavonas quando a temperatura foi elevada até 40 °C. A figura 10 mostra que não houve perda específica de nenhuma das isoflavonas analisadas com o aquecimento, tanto na fase de extração como na de concentração do extrato.

4.1.2. Extração Semi-Industrial

Dos 25 litros de molassa que foram extraídos, obteve-se 57 g de isoflavonas, que foram purificados através da coluna para extração em fase sólida, da qual obtivemos 47 g de isoflavonas purificadas. Isso demonstra um rendimento de 81% para o método utilizado (figura 11). Através da figura 12, observamos que houve uma perda maior de daidzina (5%), porque essa isoflavona é mais polar, e portanto, mais hidrossolúvel, sendo arrastada na água de lavagem mais que as outras. Este método foi eficiente para a remoção de interferentes do extrato que poderiam influenciar o nosso resultado final, tais como, saponinas e carboidratos. A figura 13 representa o resultado da cromatografia em camada delgada para determinação de saponina, mostrando que o extrato bruto e a água de lavagem tinham a presença de saponinas, mas o extrato purificado pela extração em fase sólida estava isento de saponinas.

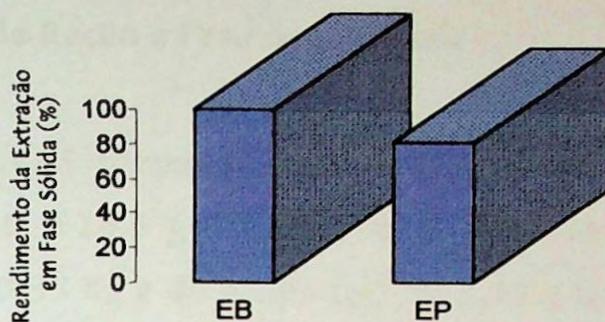


Figura 11 - Rendimento percentual da extração em fase sólida. EB-extrato bruto antes de ser aplicado na coluna (100%); EP-extrato purificado pela coluna (81%).

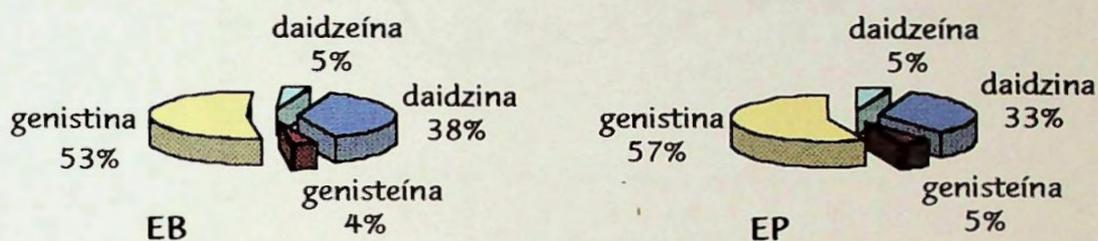


Figura 12 - Percentual de cada isoflavona no extrato bruto antes de ser aplicado na coluna (EB) e no extrato purificado pela coluna C 18 (EP)

EB	AL	EP	PS

Figura 13 - Determinação de saponinas por cromatografia em camada delgada (EB - extrato bruto, AL - água de lavagem, EP - extrato purificado, PS - padrão de saponina)

4.2. Consumo de Ração e Peso dos Animais

O grupo CAS consumiu $72,8 \pm 10,2$ g de ração por dia, e o grupo ISO, $68,0 \pm 14,5$ g (figura 14). O peso dos animais do grupo CAS foi $1,72 \pm 0,33$ Kg e do grupo ISO foi $2,12 \pm 0,34$ Kg (figura 15).

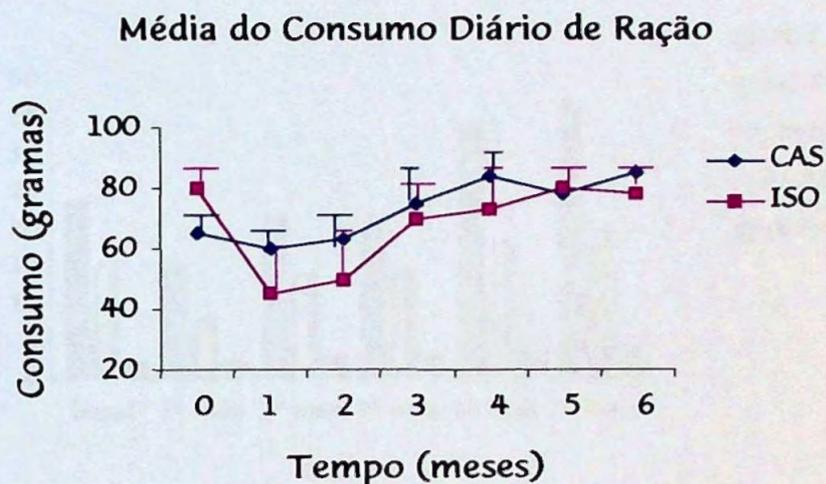


Figura 14 - Consumo de ração (gramas por dia).

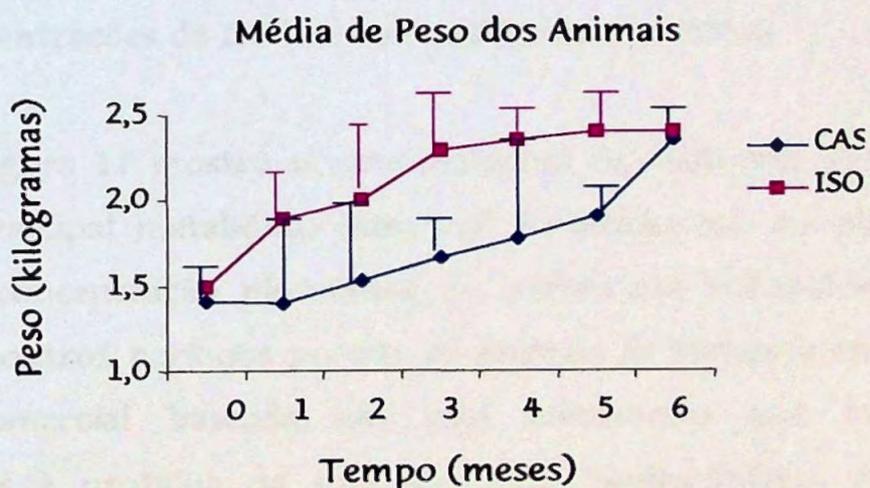


Figura 15 - Peso dos animais (kilogramas).

Não foi possível manter exatamente a dose de $5,1$ mg/Kg/dia devido a perdas durante a secagem da ração e devido à rápida variação de peso dos animais. Portanto, a média de consumo dos

animais foi de $5,1 \pm 1,3$ mg/dia/kg de peso (figura 16). No tempo basal, todos os animais estavam consumindo uma ração comercial contendo soja, mesmo que ainda não tivessem iniciado a ração experimental enriquecida com isoflavonas.

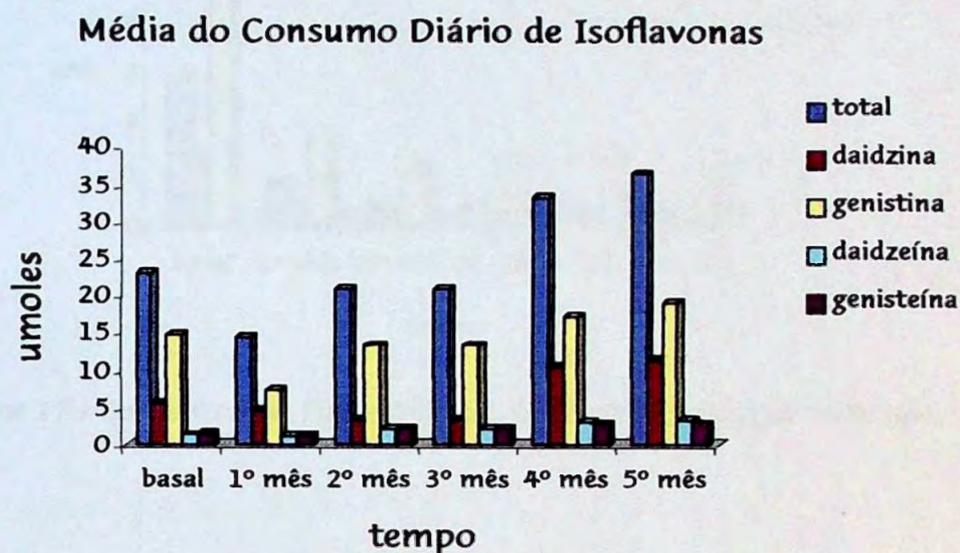


Figura 16 - Consumo de isoflavonas em umoles por dia por coelho

4.3. Concentrações de Isoflavonas no Plasma e na Urina

A figura 17 mostra as concentrações de daidzeína, genisteína e equol (principal metabólito intestinal da daidzeína) no plasma. No basal, a concentração plasmática de isoflavonas foi maior que em todos os outros períodos porque os animais se alimentavam de uma ração comercial baseada em soja mostrando que isoflavonas associadas à proteína da soja são mais biodisponíveis. Porém, as concentrações encontradas no plasma, no decorrer do período experimental, mostram que mesmo em menor proporção, as isoflavonas não associadas à proteína da soja são absorvidas e biodisponíveis para exercer suas atividades biológicas.

Conc. Plasmática de Isoflavonas

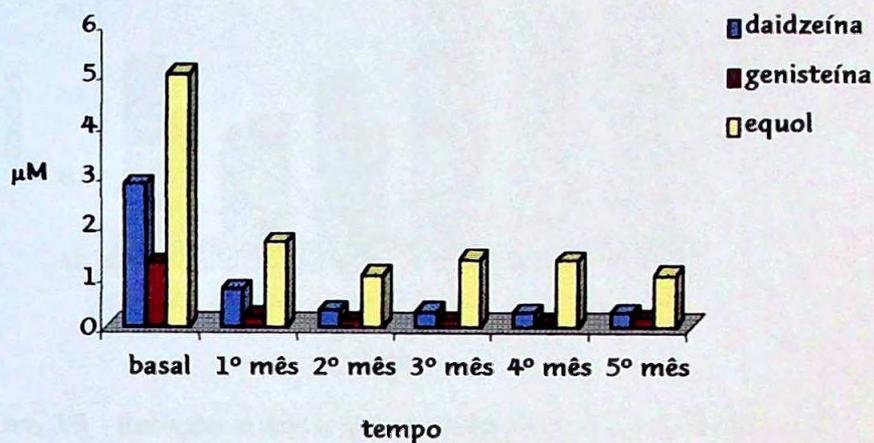


Figura 17 - Concentração Plasmática de Isoflavonas ao longo do tempo

Excreção Urinária

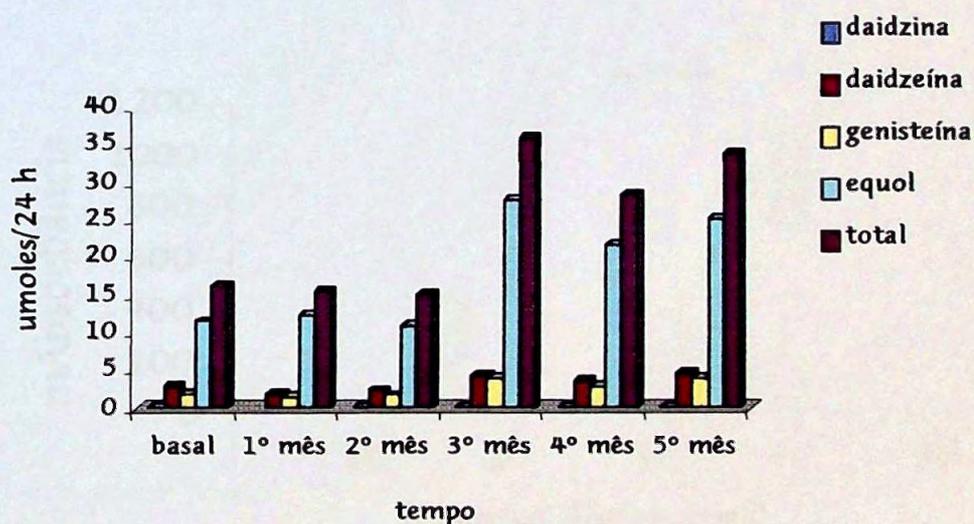


Figura 18 - Excreção urinária de isoflavonas em micromoles/24 horas

Embora as concentrações plasmáticas não tenham variado muito ao longo do tempo, vemos que a quantidade excretada variou proporcionalmente à quantidade ingerida (figura 19).

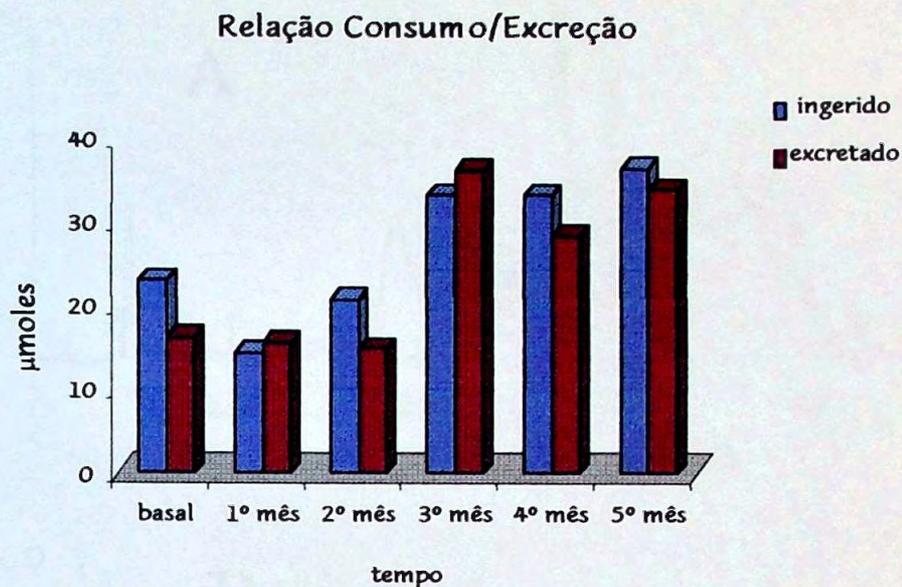


Figura 19 - Relação entre a quantidade ingerida e excretada de isoflavonas em 24 horas

4.4. Cromatogramas das Isoflavonas obtidos por HPLC

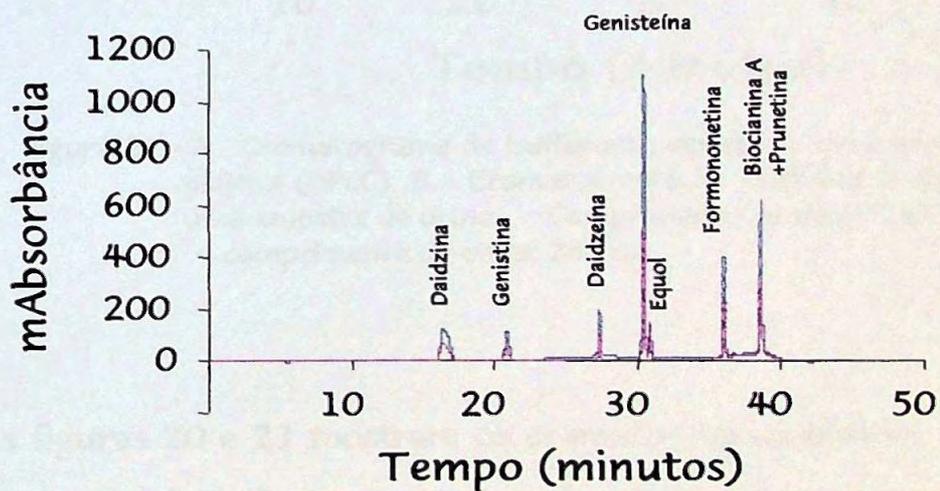


Figura 20 - Cromatograma obtido da injeção de uma mistura de padrões de isoflavonas (HPLC). — Comprimento de onda: 262 nm, — comprimento de onda: 280 nm.

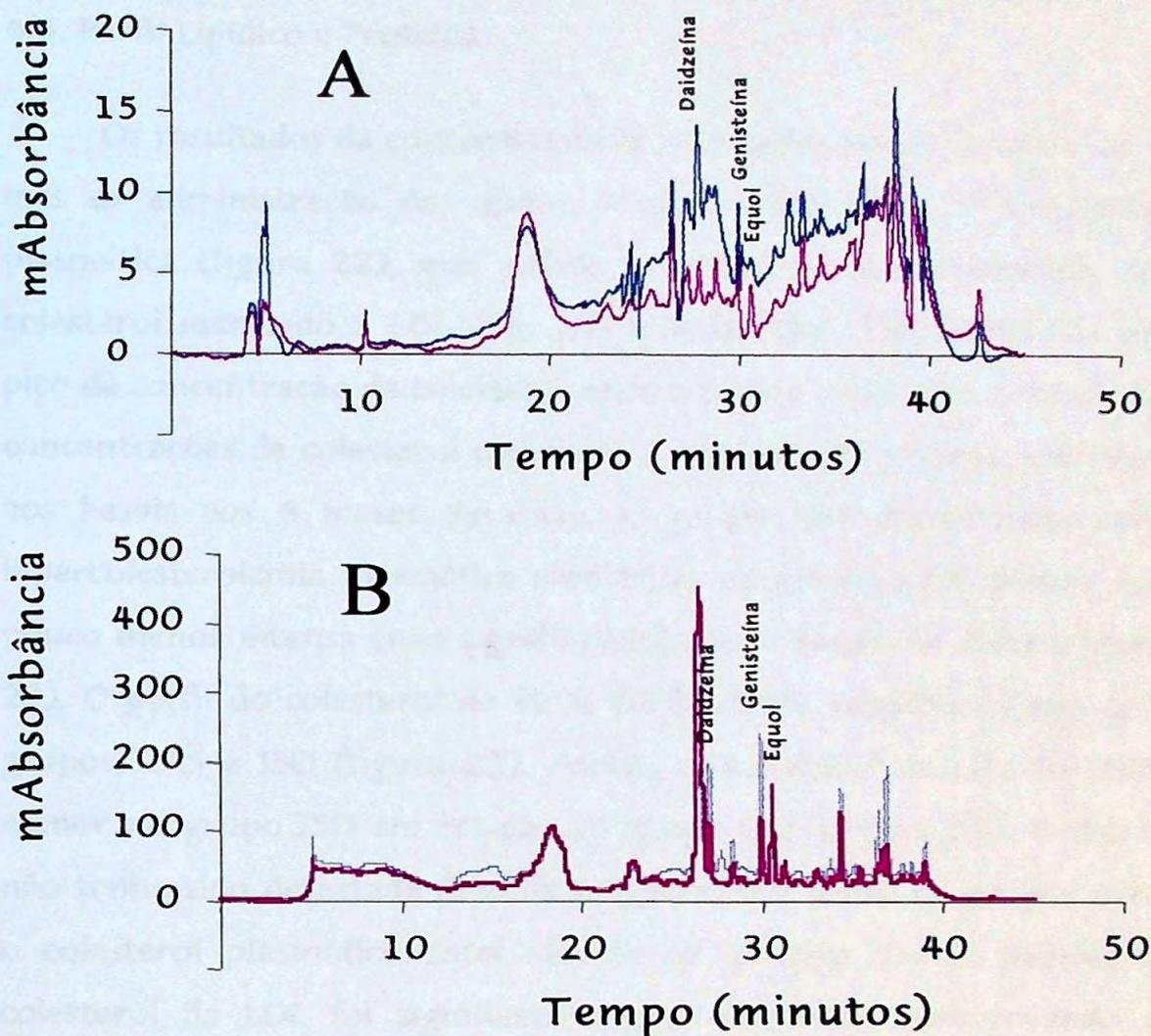


Figura 21 - A - Cromatograma de isoflavonas obtido de uma amostra de plasma (HPLC). B - Cromatograma de isoflavonas obtido de uma amostra de urina. — Comprimento de onda: 262 nm, — comprimento de onda: 280 nm.

As figuras 20 e 21 mostram os cromatogramas obtidos de uma mistura de padrões, de uma amostra de plasma e uma amostra de urina. O equol é melhor detectado em 280 nm e as demais isoflavonas são detectadas em 262 nm. Os picos correspondentes aos glicosídeos genisteína e daidzina não são vistos na escala mostrada.

4.5. Perfil Lipídico e Protéico

Os resultados da concentração de colesterol mostram que com 1 mês de administração das dietas, inicia-se uma hipercolesterolemia plasmática (figura 22), que reflete principalmente um aumento de colesterol associado à LDL (fig. 24) e VLDL (fig. 23), atingindo um pico de concentração de colesterol após 2 meses. Após esse período, as concentrações de colesterol começam a regredir até valores próximos aos basais aos 6 meses da dieta. O grupo ISO desenvolveu uma hipercolesterolemia plasmática similar ao do grupo CAS, porém um pouco menos intensa (não significativo) aos 2 meses da dieta (figura 22). O perfil do colesterol da VLDL foi bastante semelhante nos dois grupos, CAS e ISO (figura 23). Porém, o colesterol da LDL foi 26% menor no grupo ISO em relação ao grupo CAS (figura 24). Embora, não tenha sido detectada diferença significativa entre os grupos para o colesterol plasmático total, devido ao elevado desvio padrão, o colesterol da LDL foi significativamente diferente, comprovando o efeito hipocolesterolêmico das isoflavonas.

As concentrações de colesterol da HDL (figura 25) reduziram-se significativamente nos tempos 1 e 2 meses no grupo CAS e, posteriormente, aumentaram aos 6 meses. Em contrapartida, enquanto no grupo CAS o colesterol da HDL diminuiu, no grupo ISO aumentou 28 % (figura 25), principalmente aos 30 dias da dieta, quando a hipercolesterolemia se inicia, e aos 60 dias diminuiu um pouco, quando os níveis de colesterol plasmático atingem o pico, porém ainda continua maior em relação ao grupo CAS. Quando os níveis plasmáticos de colesterol diminuem, o HDL-colesterol aumenta.

As concentrações plasmáticas de genisteína, daidzeína e equol correlacionaram-se negativamente com a concentração de colesterol

da VLDL e LDL. A concentração de equol correlacionou-se positivamente com o colesterol da HDL. (tabela 2)

A tabela 1 mostra a comparação entre os resultados de colesterol nos tempos de 1 a 6 meses e o seus respectivos valores basais.

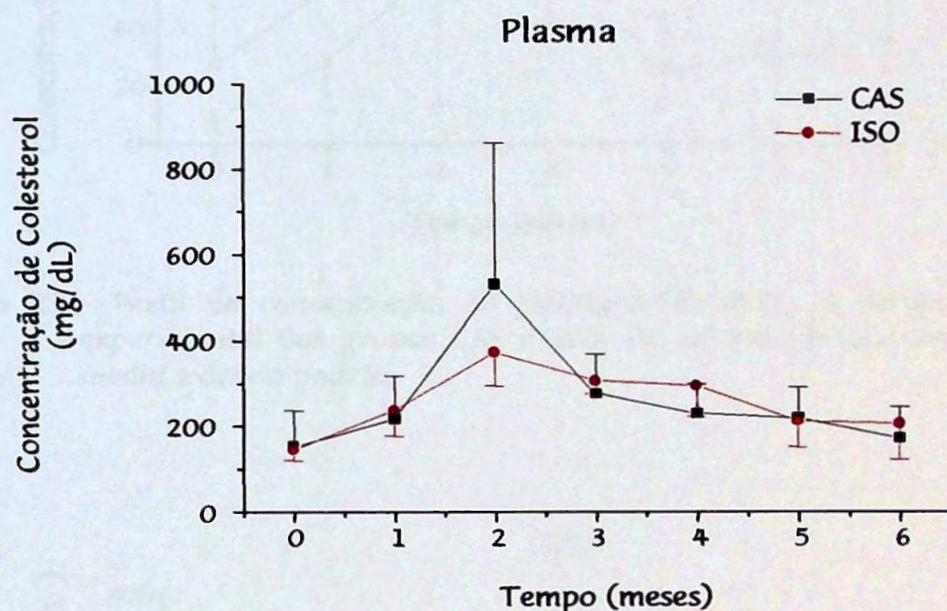


Figura 22 - Perfil da concentração plasmática de colesterol ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

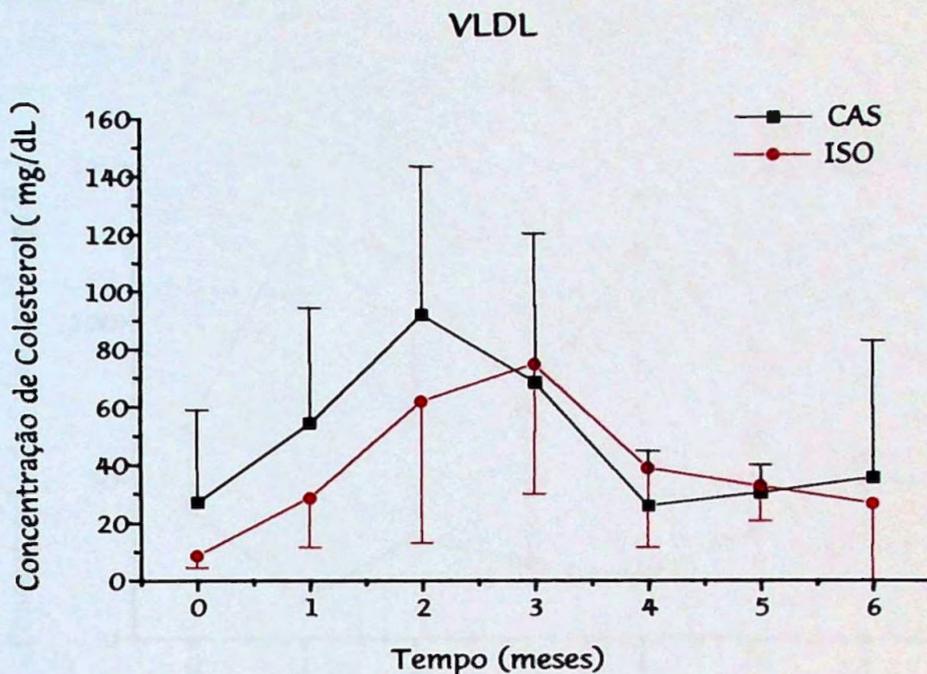


Figura 23 - Perfil da concentração de colesterol da VLDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

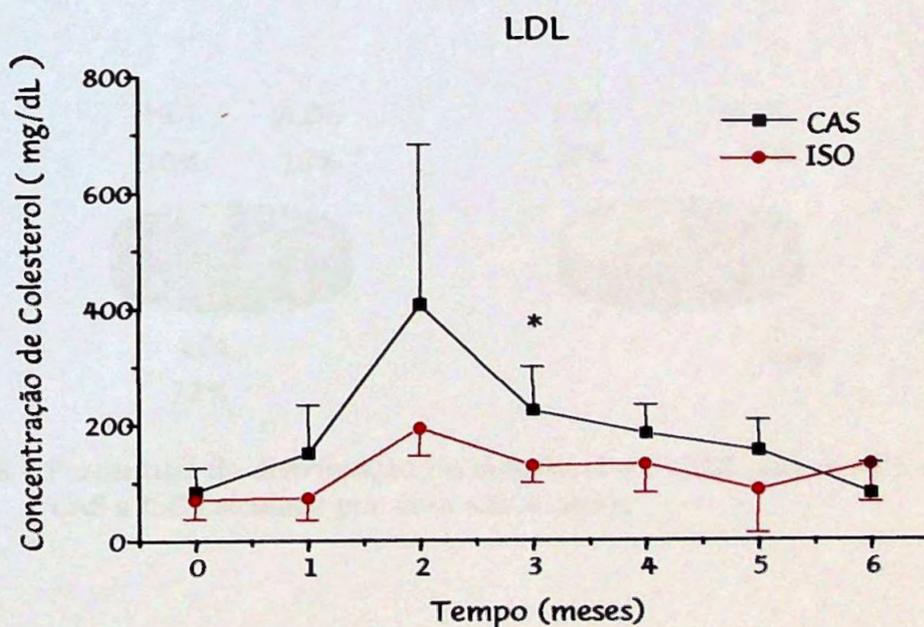


Figura 24 - Perfil da concentração de colesterol da LDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. * Diferença significativa ($p=0,032$) entre os grupos. Diferença significativa de área sob a curva ($p<0,042$).

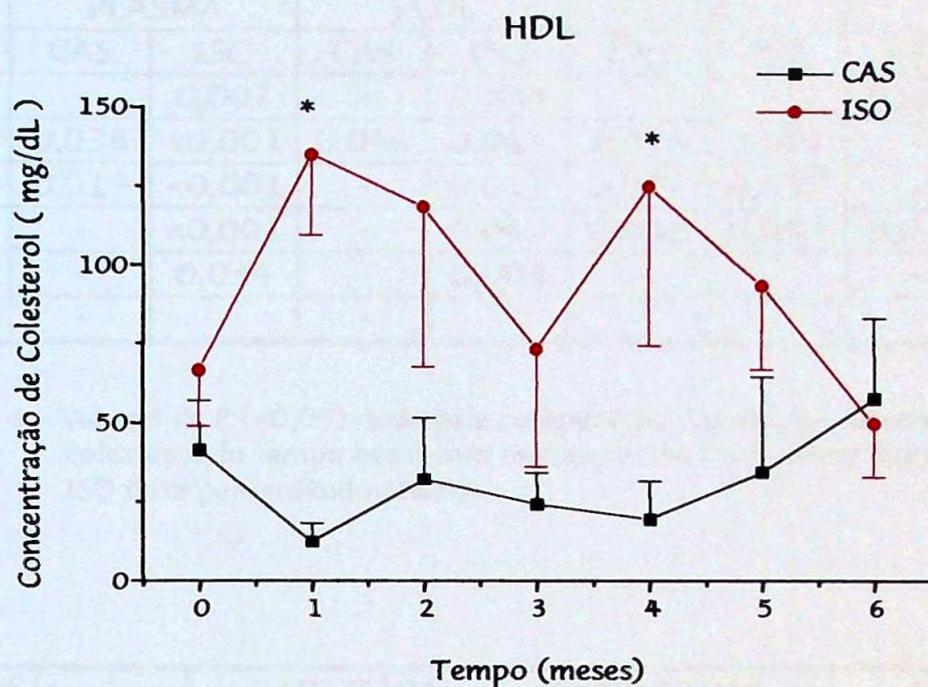


Figura 25 - Perfil da concentração de colesterol da HDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. * Diferença significativa ($p=0,021$) entre os grupos. Diferença significativa de área sob a curva ($p<0,001$).

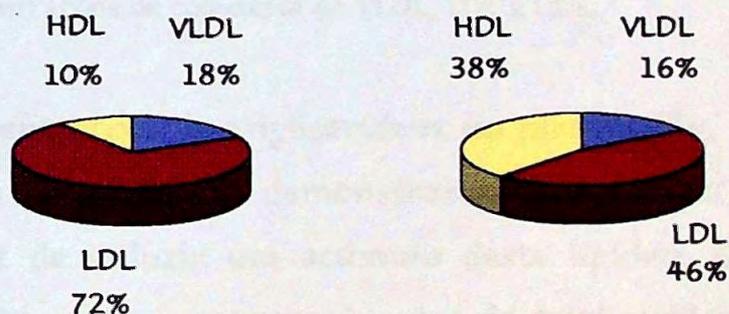


Figura 26 - Percentual de distribuição do colesterol na VLDL, LDL e HDL dos grupos CAS e ISO calculada por área sob a curva.

CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL								
Valor de P	PLASMA		VLDL		LDL		HDL	
	CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO
T1	-	0,007	-	0,034	-	-	0,005	0,001
T2	0,038	<0,001	0,044	0,041	0,033	0,001	-	-
T3	0,019	<0,001	-	0,011	0,007	0,017	-	-
T4	-	<0,001	-	0,040	0,008	0,050	0,040	0,040
T5	-	0,034	-	0,003	-	-	-	-
T6	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 1 - Valores de P (<0,05) dado pela comparação das médias da concentração de colesterol do tempo basal com os tempos de 1 a 6 meses dos grupos CAS e ISO feita pelo método ANOVA.

r ² /p	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	EQUOL
Colesterol VLDL	-0,31/0,017	-0,28/0,031	-0,29/0,027
Colesterol LDL	-0,29/0,025	-0,26/0,048	-0,31/0,016
Colesterol HDL	-	-	0,29/0,0239

Tabela 2 - Correlações entre as concentrações das isoflavonas daidzeína, genisteína e equol e as concentrações de colesterol da VLDL, LDL e HDL.

As concentrações de triglicérides no plasma (fig. 27), na VLDL (fig. 28) e na LDL (fig. 29) demonstraram que a dieta experimental não foi capaz de induzir um acúmulo deste lipídeo. A presença de isoflavonas não afetou as concentrações de triglicérides. A tabela 3 mostra a comparação das médias da concentração de triglicérides do basal com os tempos de 1 a 6 meses dos grupos CAS e ISO.

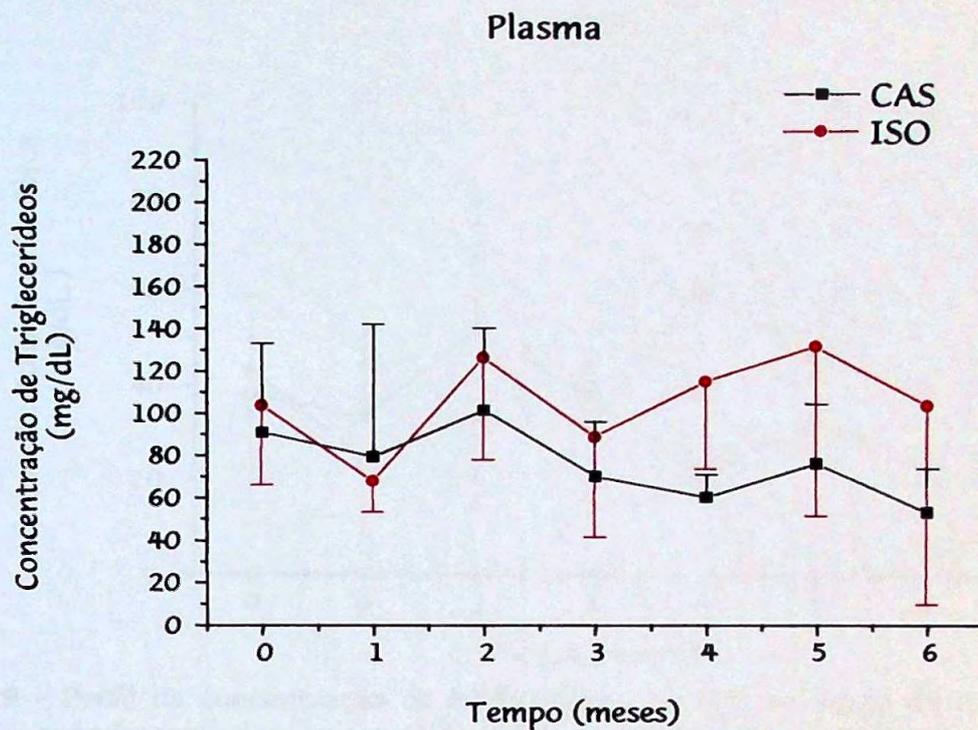


Figura 27 - Perfil da concentração plasmática de triglicerídeos ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

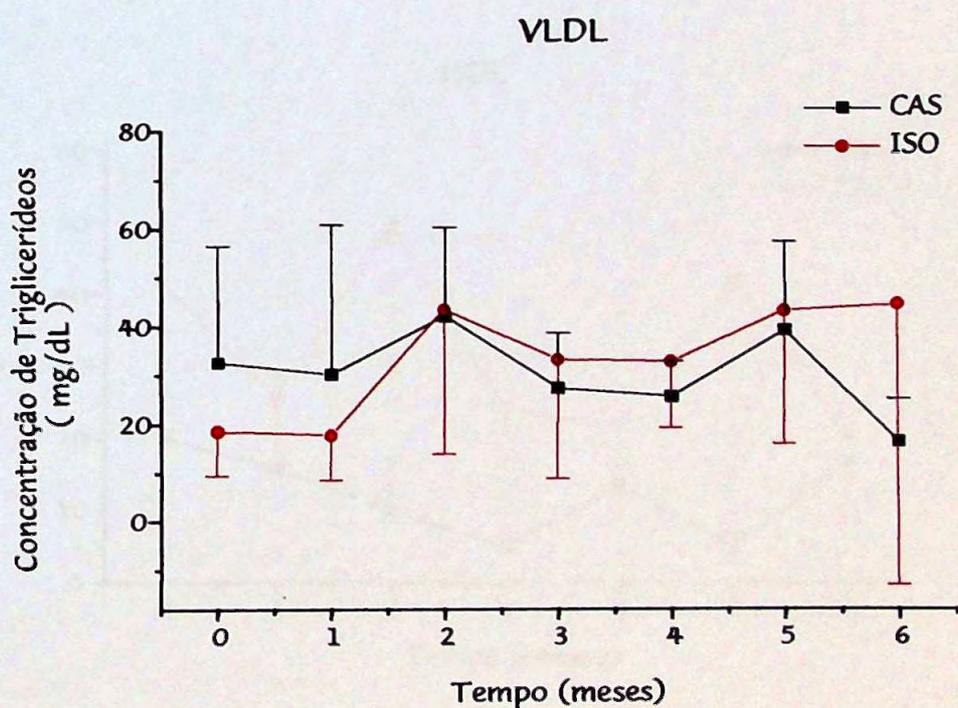


Figura 28 - Perfil da concentração de triglicerídeos da VLDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

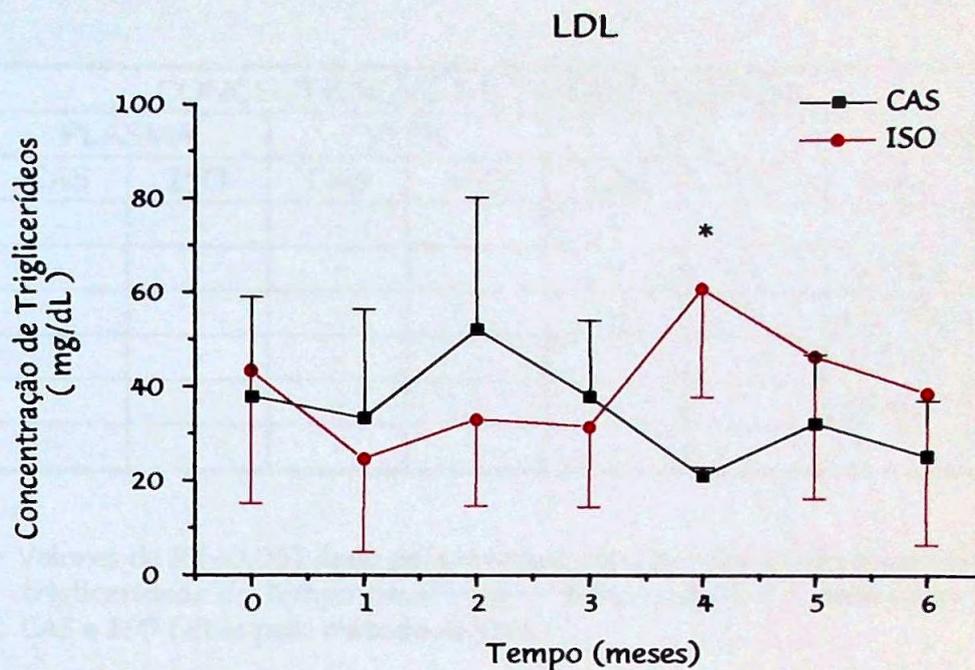


Figura 29 - Perfil da concentração de triglicerídeos da LDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. * Diferença significativa ($p=0,021$) entre os grupos.

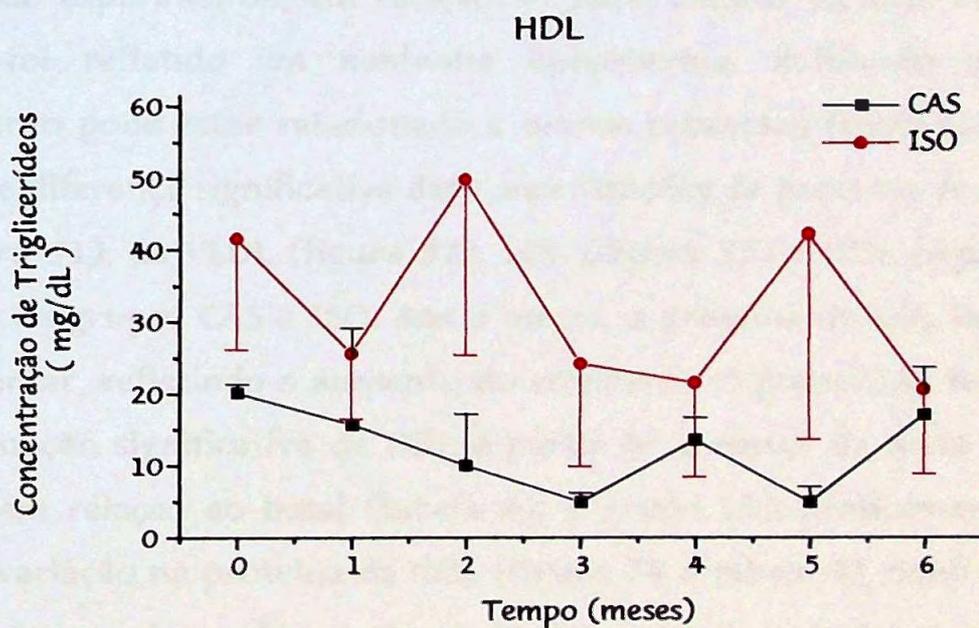


Figura 30 - Perfil da concentração de triglicerídeos da HDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS								
Valor de P	PLASMA		VLDL		LDL		HDL	
	CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO
T1	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	-	-	-	-	-	-	0,015	-
T3	-	-	-	-	-	-	<0,001	-
T4	-	-	-	-	-	-	0,002	-
T5	-	-	-	-	-	-	<0,001	-
T6	-	-	-	-	-	-	-	0,042

Tabela 3 - Valores de P (<0,05) dado pela comparação das médias da concentração de triglicerídeos do tempo basal com os tempos de 1 a 6 meses dos grupos CAS e ISO feitas pelo método ANOVA.

Embora tenha sido observado um aumento significativo na concentração de proteínas plasmáticas do grupo CAS ao longo do período experimental, em relação ao basal (tabela 4), este aumento não foi refletido em nenhuma lipoproteína, indicando que tal aumento pode estar relacionado a outros processos fisiológicos. Não houve diferença significativa das concentrações de proteína do plasma (figura 31), da VLDL (figura 32), LDL (figura 33) e HDL (figura 34) entre os grupos CAS e ISO. Aos 3 meses, a proteína da LDL tendeu a aumentar, refletindo o aumento do colesterol. O grupo CAS teve uma diminuição significativa da HDL à partir de 2 meses da dieta (figura 34), em relação ao basal (tabela 4); o grupo ISO praticamente não teve variação na proteína da HDL (figura 34 e tabela 4), confirmando os maiores valores de colesterol da HDL para esse grupo. A tabela 4 mostra a comparação das médias da concentração basais de proteínas com aquela dos tempos de 1 a 6 meses dos grupos CAS e ISO

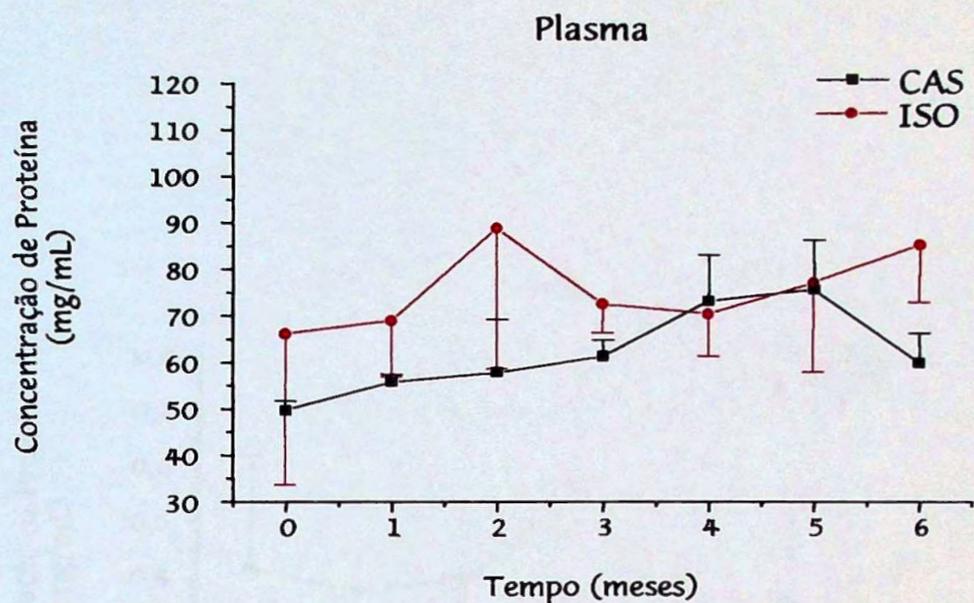


Figura 31 - Perfil da concentração de proteína plasmática ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

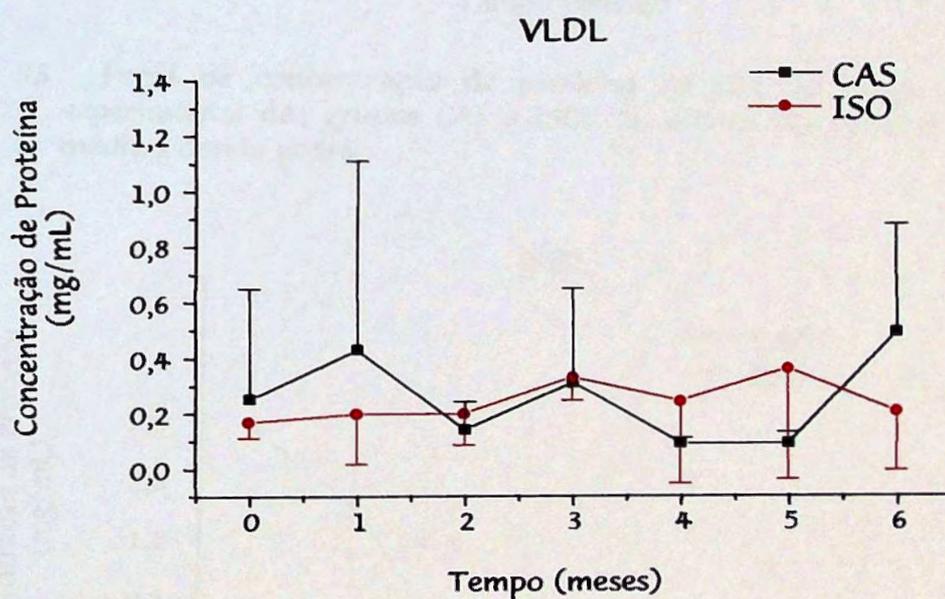


Figura 32 - Perfil da concentração de proteína da VLDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

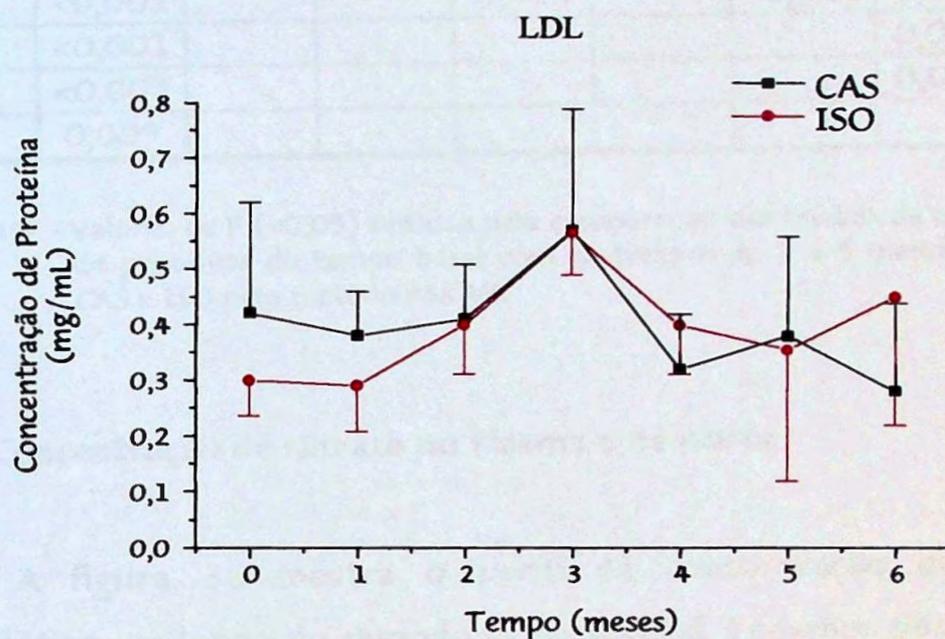


Figura 33 - Perfil da concentração de proteína da LDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

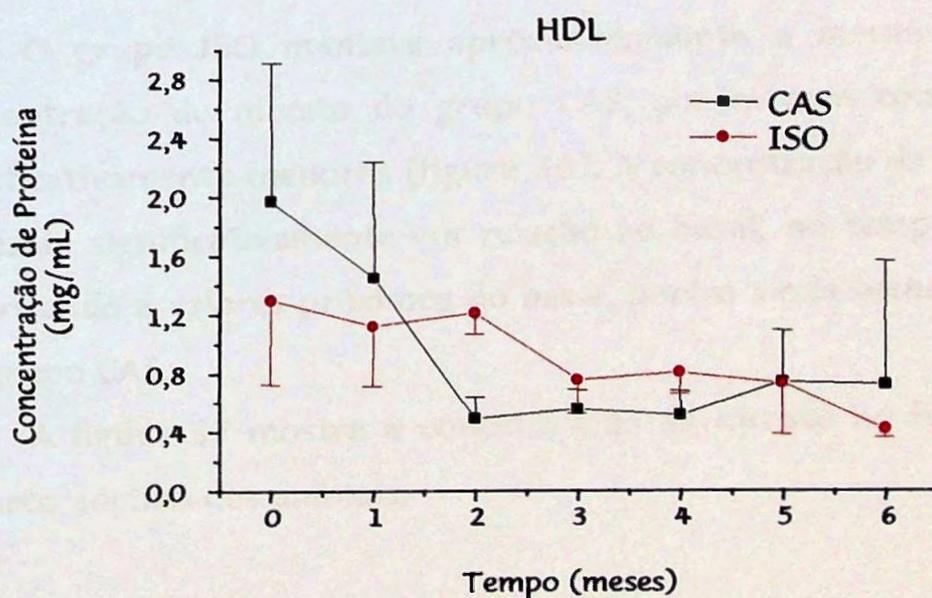


Figura 35 - Perfil da concentração de proteína da HDL ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA								
Valor de P	PLASMA		VLDL		LDL		HDL	
	CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO
T1	0,001							
T2							0,008	
T3	<0,001			0,008		<0,001	0,010	
T4	<0,001						0,009	
T5	<0,001						0,025	
T6	0,009							0,009

Tabela 4 - Valores de P (<0,05) obtidos pela comparação das médias da concentração de proteínas do tempo basal com os tempos de 1 a 6 meses dos grupos CAS e ISO pelo método ANOVA.

4.6. Concentração de Nitrato no Plasma e na Aorta

A figura 36 mostra o perfil da concentração de nitrato plasmático, ao longo do período experimental. Podemos observar um leve aumento (não significativo em relação ao basal) das concentrações de nitrato plasmático aos trinta dias da dieta, e, posteriormente, uma redução desses valores.

O grupo ISO manteve aproximadamente o mesmo perfil da concentração de nitrato do grupo CAS, porém com concentrações significativamente menores (figura 36). A concentração de nitrato foi reduzida significativamente em relação ao basal, no tempo 4 meses, retornando a valores próximos do basal, porém ainda menores que os do grupo CAS.

A figura 37 mostra a concentração de nitrato no homogenato do arco aórtico dos animais.

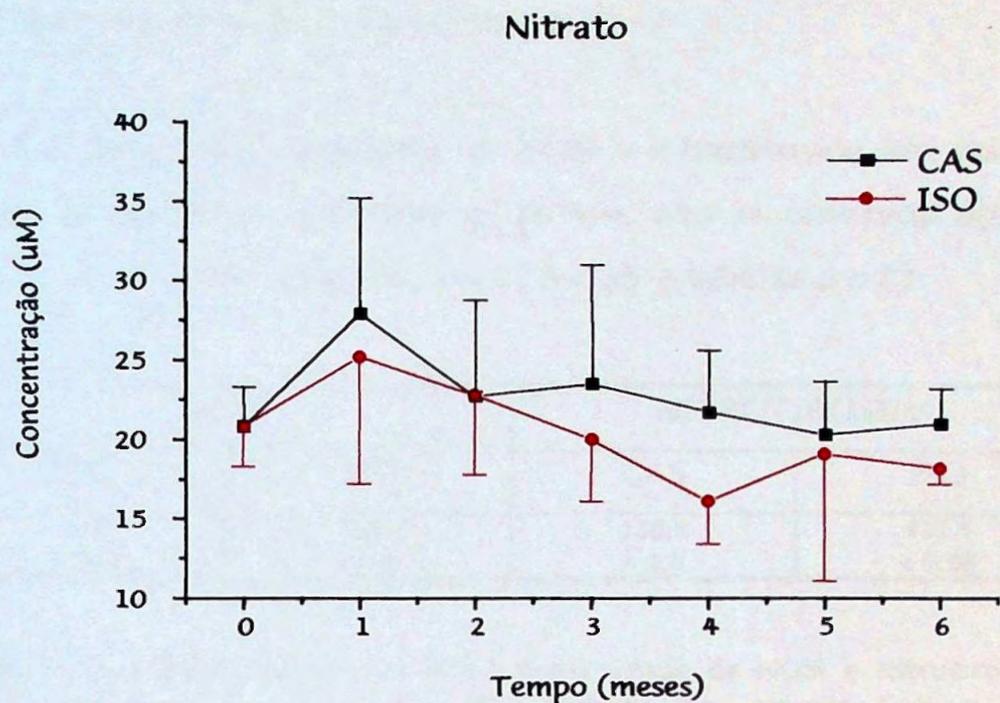


Figura 36 - Perfil da concentração plasmática de nitrato ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos (área sob a curva, $p=0,047$).

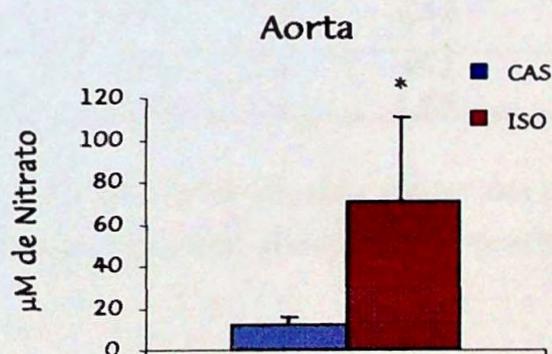


Figura 37 - Concentração de nitrato em homogenatos do arco aórtico dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos ($p=0,010$).

4.7. Expressão de iNOS e Nitrotirosina

Foi detectada a presença de NOSi e nitrotirosina em aortas de coelhos alimentados com caseína, porém, não se observou diferença entre os grupos CAS e ISO (figuras 38 e 39 e tabelas 6 e 7).

NOSi		NITROTIROSINA	
CAS	ISO	CAS	ISO
140 ± 25,8	122,5 ± 1,3	136,8 ± 1,8	137,4 ± 0,98

Tabela 6 - Densidade Relativa da Imunorreatividade de NOSi e Nitrotirosina de cortes do arco aórtico dos coelhos dos grupos CAS e ISO. A imunorreção produzida é expressa como a média da densidade óptica em uma escala de 0 (branco) a 255 (preto). Valores são média ± desvio padrão.

NOSi		NITROTIROSINA	
CAS	ISO	CAS	ISO
45,09 ± 20,1	47,6 ± 10,5	45,2 ± 4,4	47,6 ± 2,7

Tabela 7 - Percentual da área de cortes do arco aórtico dos coelhos dos grupos CAS e ISO com Imunorreatividade de iNOS e Nitrotirosina.

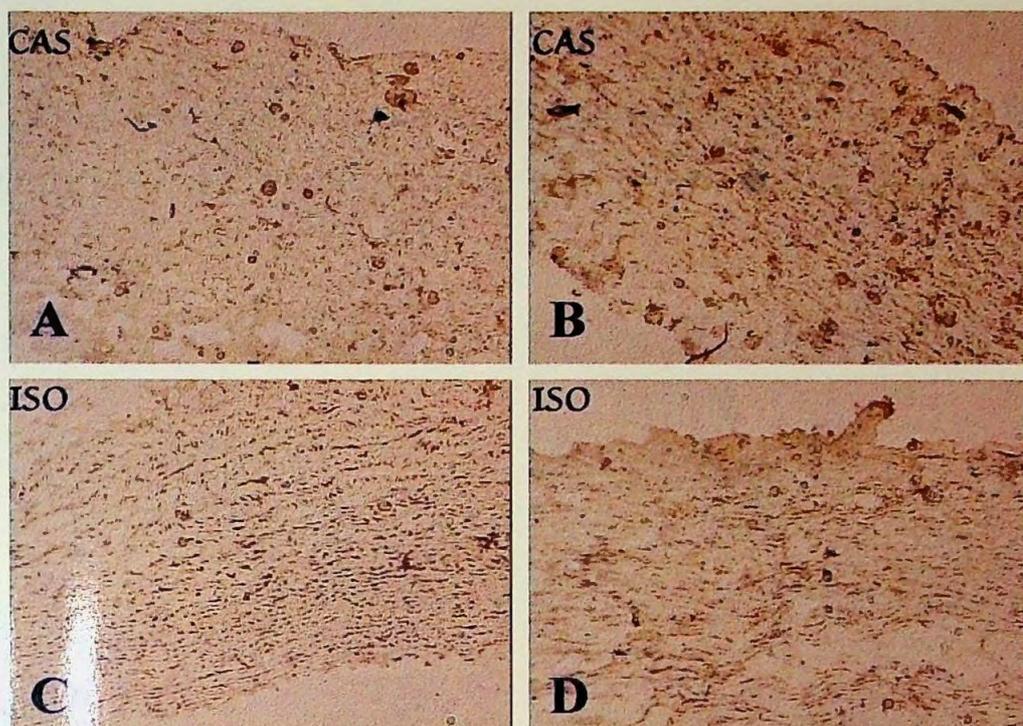


Figura 38 - Fotomicrografia da análise imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-NOS do arco aórtico de coelhos do grupo CAS (A e B) e do grupo ISO (C e D). Aumento original de 100 vezes. A coloração em castanho indica a imunorreatividade.

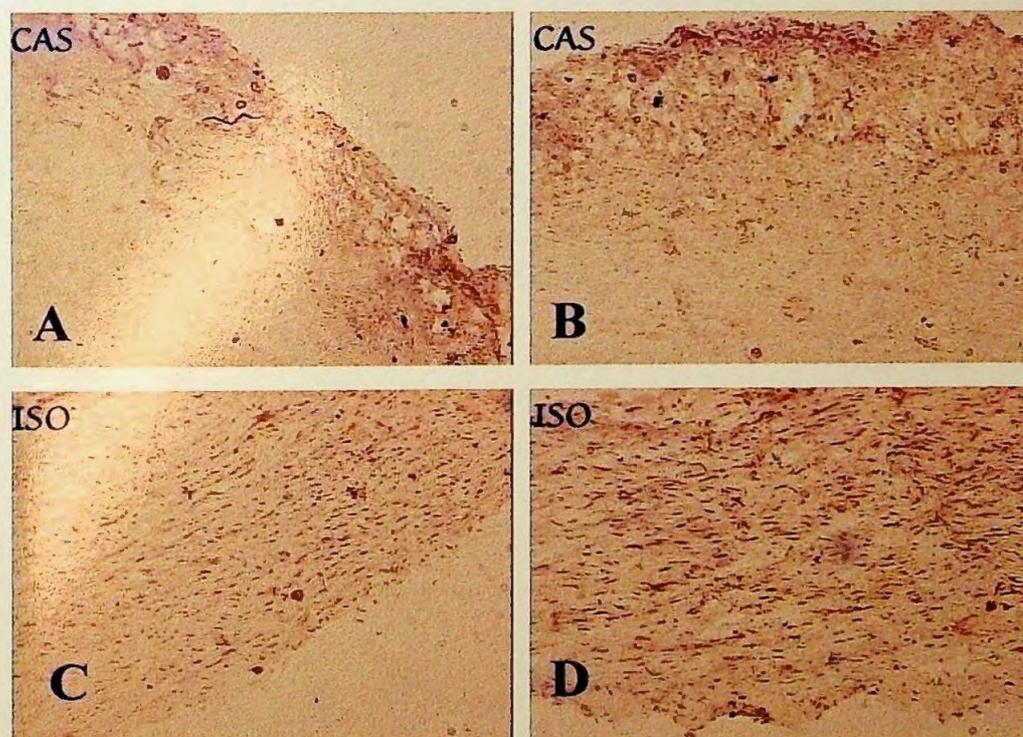


Figura 39 - Fotomicrografia da análise imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-nitrotirosina do arco aórtico de coelhos do grupo CAS (A e B) e do grupo ISO (C e D). Aumento original de 100 vezes. A coloração em castanho indica a imunorreatividade.

A figura 40 mostra a colocalização de iNOS e nitrotirosina em cortes seriados do arco aórtico na região subendotelial da aorta.

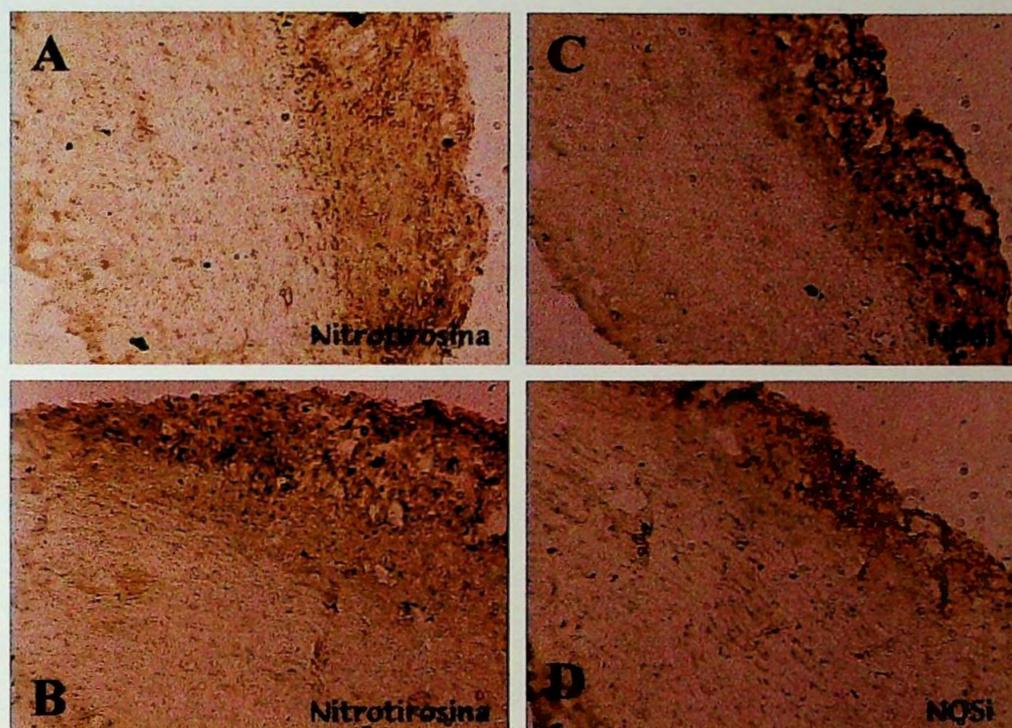


Figura 40 - Fotomicrografia da análise imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-nitrotirosina (A e B) e anti-iNOS (C e D) do arco aórtico de coelhos mostrando colocalização de nitrotirosina e iNOS (A e C; B e D) em cortes seriados. Aumento original de 100 vezes. A coloração em castanho indica a imunorreatividade.

4.8. Expressão de Proteínas de Choque Térmico

Em geral, a HSC70 mostrou-se a proteína de choque térmico mais abundante (coloração mais intensa) nas artérias ateroscleróticas, por ser constitutiva, seguida da HSP60 e da HSP70 (figura 41 e tabelas 8 e 9). As três proteínas estavam presentes tanto na íntima como na média. A figura 41 mostra que a região subendotelial das artérias teve coloração mais intensa, principalmente para a HSC70 (figura 39-D), mostrando uma maior expressão dessas proteínas nas áreas de lesão. A ingestão de isoflavonas reduziu a expressão dessas proteínas (tabelas 8 e 9).

HSP60*		HSP70*		HSC70*	
CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO
88,9 ± 1,9	74,3 ± 1,7	86,1 ± 2,0	74,6 ± 3,5	84,8 ± 1,0	72,4 ± 2,2

Tabela 8 - Densidade Relativa da Imunorreatividade de HSP60, HSP70 e HSC70 em cortes do arco aórtico dos coelhos dos grupos CAS e ISO. *P <0,001 (comparação de médias usando o teste ANOVA). A imunorreação produzida é expressa como a média da densidade óptica em uma escala de 0 (branco) a 255 (preto). Valores são média ± desvio padrão.

HSP60*		HSP70*		HSC70*	
CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO
21,4 ± 5,4	6,2 ± 3,5	15,7 ± 5,5	5,0 ± 3,7	22,3 ± 6,7	11,8 ± 5,3

Tabela 9 - Percentual de área de cortes do arco aórtico dos coelhos dos grupos CAS e ISO com Imunorreatividade de HSP60, HSP70 e HSC70. *P <0,05 (comparação de médias usando o teste ANOVA). Valores são média ± desvio padrão.

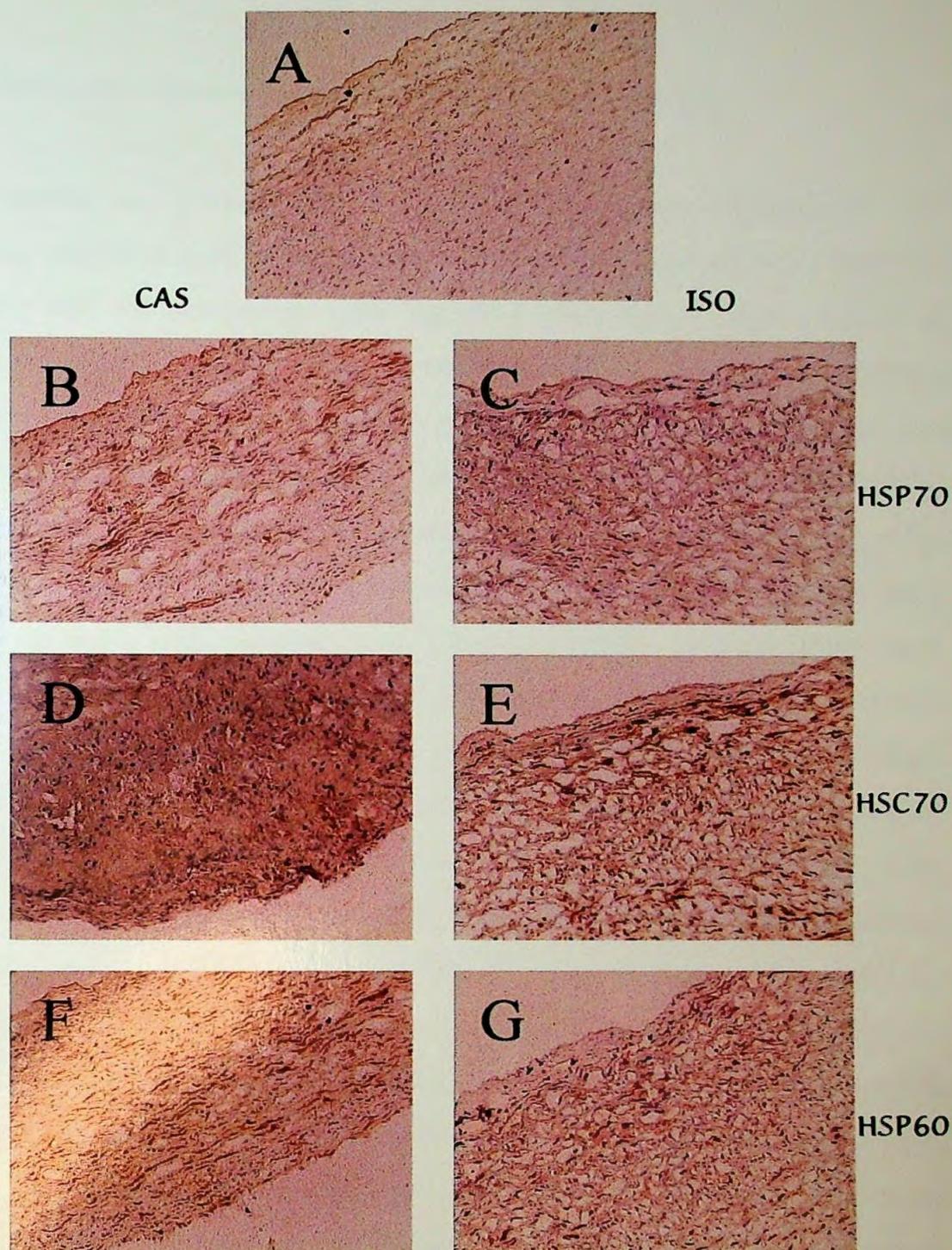


Figura 41 - Fotomicrografia da análise imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-HSP70 (B e C), anti-HSC70 (D e E) e anti-HSP60 (F e G) do arco aórtico de coelhos do grupo CAS (B, D e F) e do grupo ISO (C, E e G). A-controle negativo. Aumento original de 100 vezes. A coloração em castanho indica a imunorreatividade. Estes cortes foram contracorados com hematoxilina.

4.9. Autoanticorpos Anti-proteínas de Choque Térmico

Ambos os grupos CAS e ISO desenvolveram anticorpos anti-HSP60, HSP70 e HSC70 (figura 42), porém o grupo ISO em menores títulos. HSC 70 parece ter uma resposta mais aguda, pois o título de anticorpos anti- HSC 70 aumenta rapidamente em 1 mês e se mantém em um platô até 3 meses, quando começa a decair. A HSP60 tem uma resposta um pouco mais tardia, pois o título de anticorpo anti-HSP 60 somente atinge o pico aos 3 meses e logo começa a diminuir (grupo CAS); o grupo ISO teve um leve pico em 1 mês. A HSP70 produz uma resposta mais sutil, mantendo-se estável o título de anticorpos anti-HSP70 para o grupo CAS ao longo do período experimental, decaindo um pouco apenas aos 6 meses; em contraste, o grupo ISO tem o título de anticorpos anti- HSP70 reduzido, à partir do tempo 4 meses. Porém, desses resultados, somente a redução de anticorpos anti-HSC70 aos 5 meses foi significativa, na análise entre grupos, devido ao elevado desvio padrão. No entanto, se analisarmos o aumento do título dos anticorpos nos vários tempos, em relação ao basal (tabela 10), observamos que, na maioria dos tempos, o grupo CAS apresentou aumentos significativos e o grupo ISO teve apenas alguns (ou nenhum) tempos significativamente diferentes do basal. Os títulos de anticorpos anti-HSP60 e anti-HSC70 no soro correlacionaram-se negativamente com as concentrações de isoflavonas (tabela 11). A tabela 12 mostra as correlações entre as concentrações de colesterol e os títulos de anticorpos anti-HSPs.

A figura 43 mostra a presença de anticorpos anti-HSPs nas aortas dos animais. A figura 44 mostra o conteúdo total de IgG (mg de proteína) por mg de aorta dos grupos CAS e ISO.

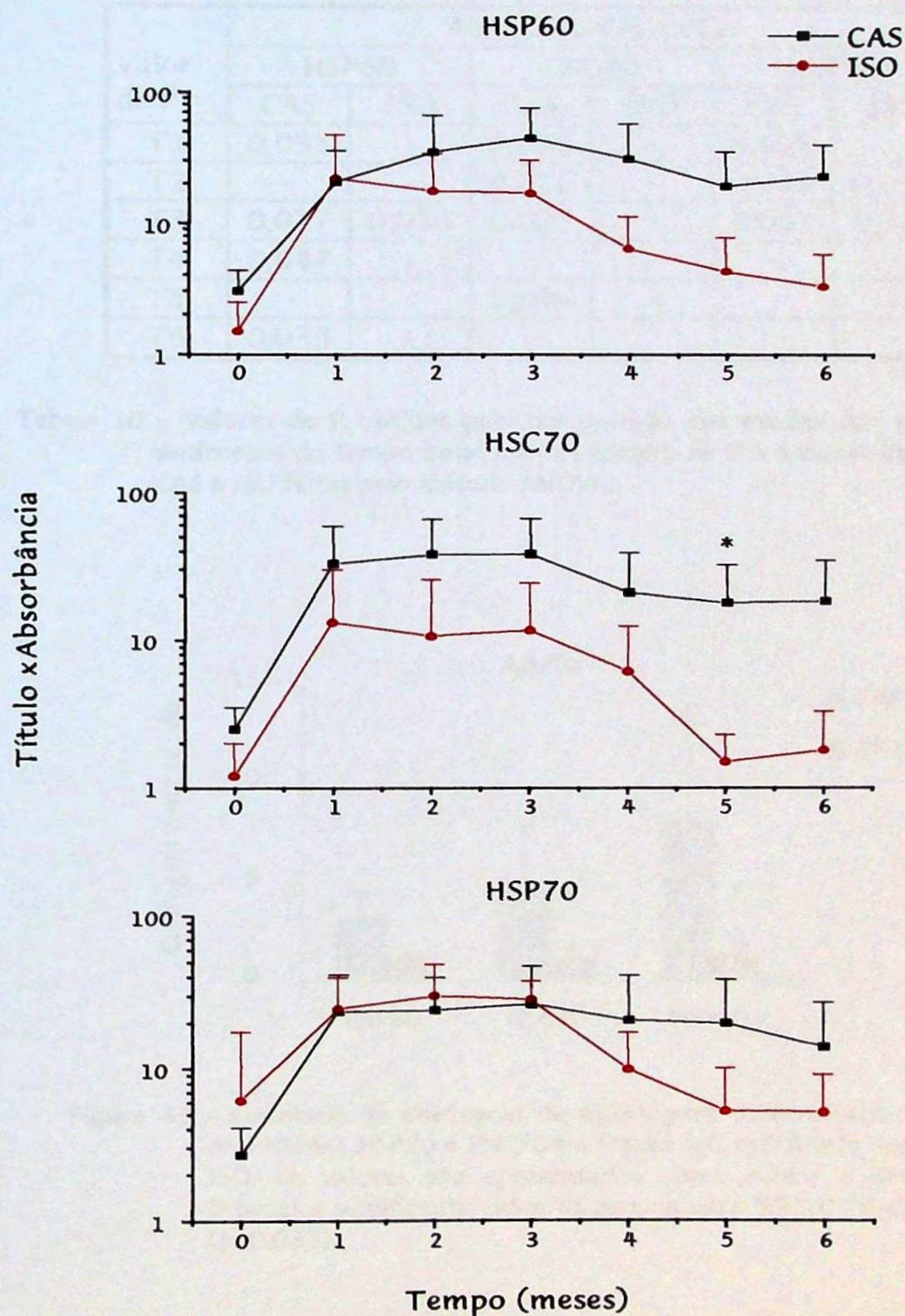


Figura 42 - Título de anticorpos anti-HSP60, HSP70 e HSC70 ao longo do período experimental dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. * Diferença significativa ($p=0,05$) entre os grupos. O resultado é apresentado em escala logarítmica.

Valor de P	ANTICORPOS ANTI-					
	HSP60		HSC70		HSP70	
	CAS	ISO	CAS	ISO	CAS	ISO
T1	0,031	-	0,032	-	0,028	-
T2	-	-	0,022	-	0,016	0,039
T3	0,017	0,033	0,023	-	0,031	0,010
T4	0,047	-	-	-	-	-
T5	-	-	0,044	-	-	-
T6	0,033	-	-	-	-	-

Tabela 10 - Valores de P obtidos pela comparação das médias dos títulos de anticorpos do tempo basal com os tempos de 1 a 6 meses dos grupos CAS e ISO feitas pelo método ANOVA.

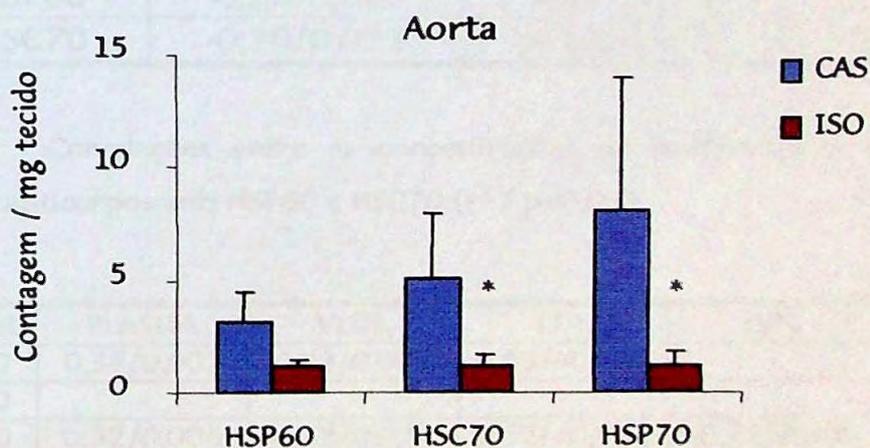


Figura 43 - Resultado da Contagem do ELISA para determinação de anticorpos anti-HSP60, HSP70 e HSC70 na fração IgG purificada dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. * Diferença significativa entre os grupos para HSC70 ($p=0,034$) e HSP70 ($p=0,033$).

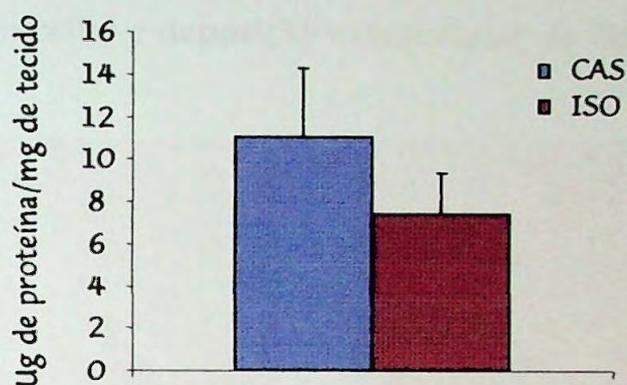


Figura 44 - Dosagem de proteína da fração IgG purificada dos grupos CAS e ISO. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

r^2/p	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	EQUOL
Anti-HSP60	-0,28/0,033	-0,27/0,039	-0,31/0,016
Anti-HSC70	-0,30/0,021	-0,28/0,031	-0,34/0,007

Tabela 11 - Correlações entre as concentrações de isoflavonas e o título de anticorpos anti-HSP60 e HSC70 ($r^2 / p < 0,05$)

COLESTEROL	PLASMA	VLDL	LDL	HDL	PROT. LDL
Anti-HSP60	0,38/0,001	0,28/0,015	0,45/<0,001	-	-
Anti-HSP70	-	-	-	-	0,30/0,0115
Anti-HSC70	0,32/0,006	0,32/0,007	0,41/<0,001	-0,31/0,008	-

Tabela 12 - Correlações entre as concentrações de colesterol do plasma e lipoproteínas e proteína da LDL com os títulos de anticorpos anti-HSP60, HSP70 e HSC70 no soro ($r^2 / p < 0,05$).

4.10. Distribuição, Área e Volume das Lesões Ateroscleróticas

A dieta aterogênica, baseada em caseína, induziu a formação de lesões caracterizadas por numerosos macrófagos contendo alto teor de lipídeos (foam cells) e deposição extracelular de lipídeos (fig. 45).

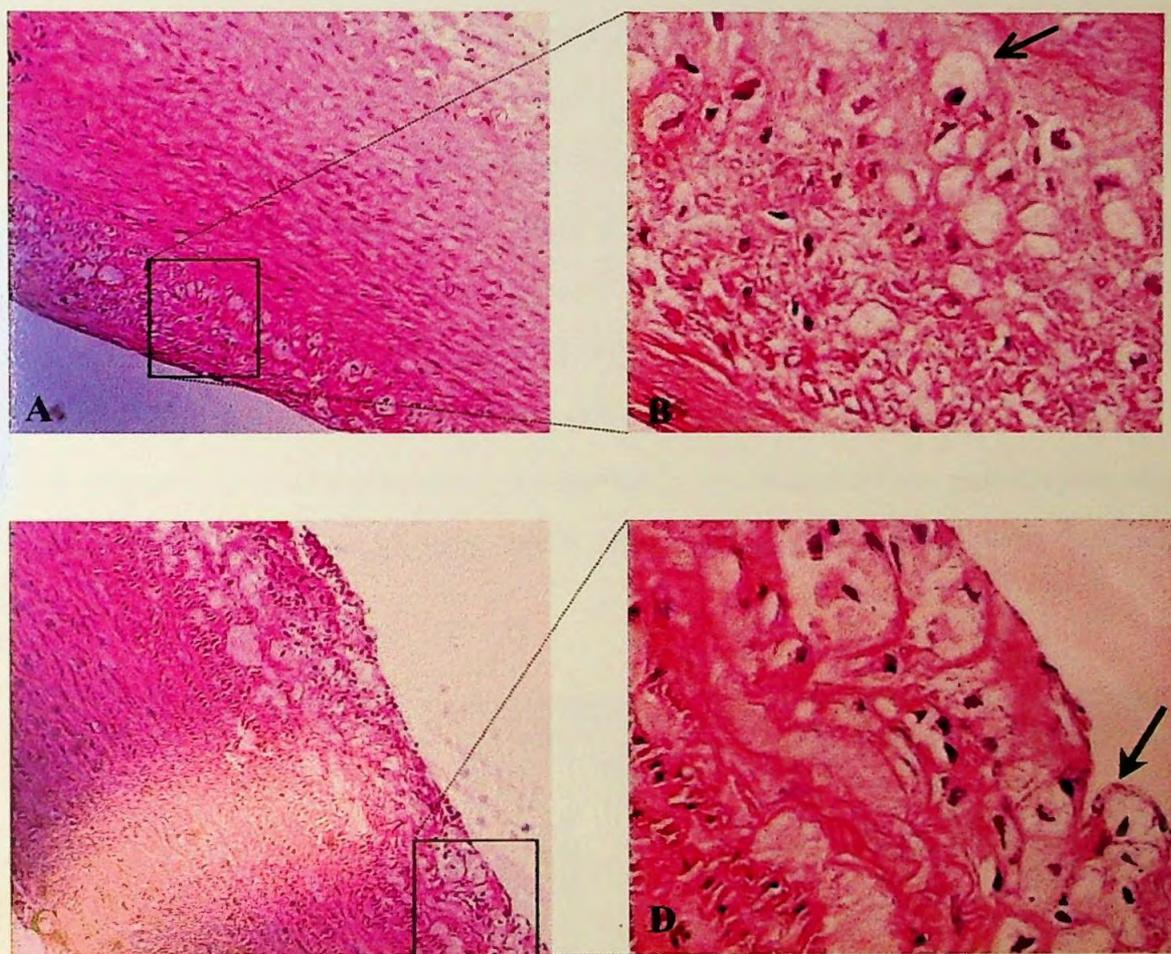


Figura 45 - Fotomicrografia de cortes transversais das lesões de 2 coelhos. A e C - aumento original de 100 vezes. B e D - aumento original de 400 vezes. As setas mostram a presença de "foam cells".

Lesões visíveis a olho nu foram detectadas no arco aórtico de 4 dos 5 coelhos (80%) do grupo CAS (figura 46) e na aorta torácica de 3 dos 5 coelhos (60%). O grupo ISO teve uma menor incidência e

gravidade de lesões ateroscleróticas que o grupo CAS (figura 47). De 5 coelhos, apenas 3 continham lesões macroscopicamente visíveis e a área macroscópica ocupada pelas lesões na aorta foi bem menor que a do grupo CAS. Dois desses coelhos tinham lesões visíveis no arco aórtico e um na aorta torácica. O coelho 4 do grupo CAS desenvolveu apenas pequenas estrias gordurosas, o que impossibilitou o cálculo de área e volume de lesão. Não foram encontradas lesões microscópicas na aorta do coelho 2 do grupo ISO.

A área e o volume (microscópicos) das lesões ateroscleróticas do grupo ISO foram menores que as do grupo CAS (52 e 48 %, respectivamente), mas não houve diferença estatística devido ao elevado desvio padrão (figura 49). Porém, o conteúdo de colesterol do arco aórtico do grupo ISO foi significativamente menor que do grupo CAS (figura 50). O colesterol da aorta correlacionou-se positivamente com o colesterol plasmático, VLDL-colesterol e LDL-colesterol (tabela 13).



Figura 45 - Digitalização da imagem das aortas dos coelhos do grupo CAS. As setas indicam as lesões macroscópicas. Nos coelhos 1, 2 e 3 são visíveis as lesões no arco aórtico e na aorta torácica. No coelho 5 é visível apenas uma pequena lesão no arco aórtico. No coelho 4 não se visualizou lesões macroscópicas.



Figura 47 - Digitalização da imagem das aortas dos coelhos do grupo ISO. As setas indicam as lesões macroscópicas. Lesões visíveis em apenas 3 coelhos: coelho3, pequenas lesões na aorta torácica; coelho5, pequenas lesões no arco aórtico; coelho6, lesões mais acentuadas no arco aórtico.

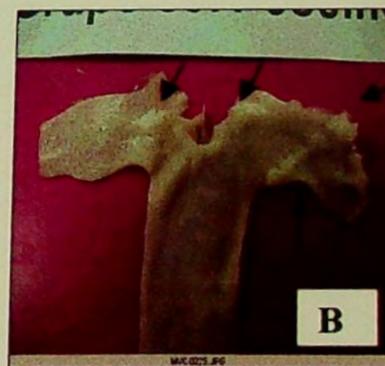
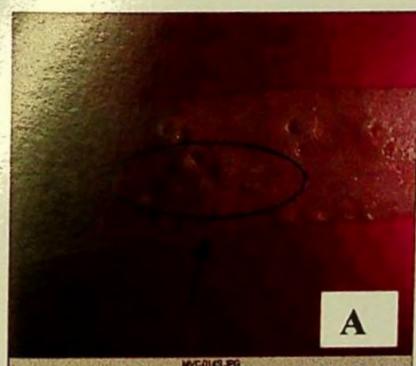


Figura 48 - A- pequenas lesões presentes na aorta torácica do coelho3-ISO.
B - Lesões um pouco maiores presentes no arco aórtico do coelho 6-ISO.

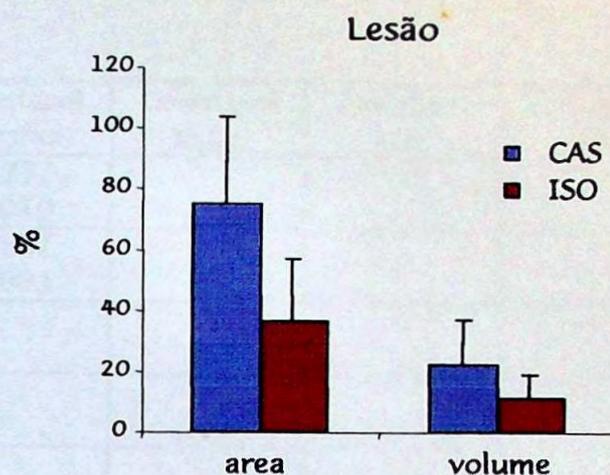


Figura 49 - À esquerda, média da área percentual de 6 cortes do arco aórtico contendo lesões. À direita, média do volume percentual de 6 cortes do arco aórtico dos grupos CAS e ISO.

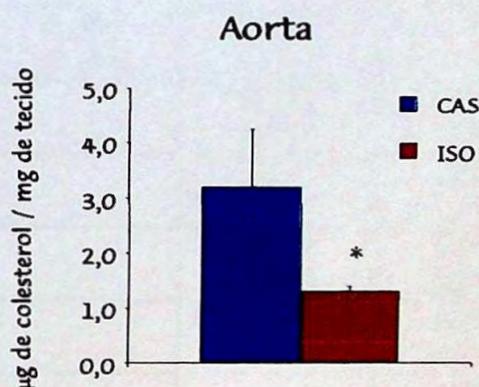


Figura 50 - Conteúdo de colesterol do arco aórtico dos grupos CAS e ISO.
* Diferença significativa entre os grupos ($p=0,014$)

A expressão de HSP60 e HSC70 correlacionou-se positivamente com a área das lesões ateroscleróticas (tabela 14). A densidade da coloração para a imunorreatividade das proteínas HSP60 e HSC70 correlacionou-se com o colesterol da LDL. O colesterol da HDL correlacionou-se negativamente com a densidade e a área de imunorreatividade para as três proteínas estudadas (tabela 13).

R ² /P	Colesterol Plasma	Colesterol VLDL	Colesterol LDL	Colesterol HDL	Nitrato Plasma
Colesterol VLDL	0,77/ 0,010				
Colesterol LDL	0,83/ 0,003				
Colesterol HDL					-0,71/ 0,022
Anti-HSP60 soro					0,74/ 0,016
Anti-HSC70 Soro					0,80/ 0,006
Nitrato Aorta				0,79/ 0,007	-0,70/ 0,025
Anti-HSP60 Aorta				-0,80/ 0,05	
Anti-HSP70 Aorta				-0,70/ 0,025	
Anti-HSC70 Aorta				-0,78/ 0,024	
Colesterol Aorta	0,78/ 0,014	0,94/ <0,001	0,79/ 0,011		
Intensid. HSP60			0,75/ 0,016	-0,91/ <0,001	0,65/ 0,0431
Intensid. HSP70				-0,81/ 0,008	
Intensid. HSC70			0,68/ 0,029	-0,91/ 0,020	
Área HSP60				-0,91/ <0,001	
Área HSP70				-0,81/ 0,009	
Área HSC70				-0,72/ 0,020	0,74/ 0,015

Tabela 13 - Correlações entre colesterol do plasma, VLDL, LDL, HDL, nitrato plasmático e todas as outras variáveis estudadas. As variáveis que foram medidas mensalmente foram expressas como área sob a curva.

R ² /P	Nitrato Aorta	Anti-HSP60 Aorta	Anti-HSP70 Aorta	Anti-HSC70 Aorta	Colesterol Aorta	Área de Lesão	Volume de Lesão	Intensid. HSP60	Intensid. HSP70	Intensid. HSC70	Área HSP60	Área HSP70	Área HSC70
Colesterol Plasma					0,78/ 0,014								
Colesterol VLDL					0,93/ <0,001								
Colesterol LDL					0,79/ 0,011			0,74/ 0,016	-0,80/ 0,008	0,68/ 0,029			
Colesterol HDL	0,79/ 0,007	-0,80/ 0,054	-0,70/ 0,025	-0,78/ 0,024				-0,91/ <0,001		-0,91/ <0,001	-0,83/ 0,003	-0,81/ 0,009	-0,72/ 0,020
Nitrato Plasma	-0,70/ 0,025							0,65/ 0,043					0,74/ 0,015
Nitrato Aorta								-0,71/ 0,021					-0,78/ 0,007
Anti-HSP60 Aorta				0,97/ 0,005				0,65/ 0,043					
Anti-HSP70 Aorta				0,96/ <0,001					0,68/ 0,045	0,65/ 0,042		0,67/ 0,049	
Anti-HSC70 Aorta			0,96/ <0,001										
Colesterol Aorta													0,77/ 0,016
Área de Lesão											0,69/ 0,029		0,66/ 0,037
Volume de Lesão						0,91/ <0,001							0,75/ 0,012
Intensid. HSP60	-0,71/ 0,020		0,65/ 0,043							0,98/ <0,001	0,89/ <0,001	0,76/ 0,019	0,68/ 0,031
Intensid. HSP70			0,68/ 0,045	0,80/ 0,031				0,94/ <0,001		0,93/ <0,001	0,84/ 0,005	0,69/ 0,039	
Intensid. HSC70			0,65/ 0,043					0,98/ <0,001	0,93/ <0,001				
Área HSP60	-0,80/ 0,005							0,89/ <0,001	0,94/ 0,005	0,82/ 0,004			
Área HSP70	-0,80/ 0,009		0,67/ 0,049					0,76/ 0,019	0,69/ 0,039	0,68/ 0,043	0,93/ <0,001		
Área HSC70	-0,78/ 0,007				0,76/ 0,016	0,037	0,75/ 0,012	0,68/ 0,031			0,78/ 0,007	0,90/ <0,001	

Tabela 14 - Correlações entre as variáveis medidas na aorta e todas as outras variáveis. As variáveis que foram medidas mensalmente foram expressas como área sob a curva.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Recentemente, o FDA (Food and Drug Administration-USA, 1999) recomendou o uso de 25 g por dia de proteína da soja para prevenção de doenças cardiovasculares. Porém, ainda não está claro quais componentes da soja são responsáveis pelos seus efeitos anti-aterogênicos. A proteína da soja, as saponinas e as isoflavonas têm se mostrado os componentes mais eficientes, porém atenção especial tem sido dada às isoflavonas.

Anthony *et al.* (1997) avaliaram o efeito das isoflavonas na formação das lesões ateroscleróticas em macacos, utilizando dois tipos de proteínas da soja, uma rica e outra pobre em isoflavonas. Estes autores verificaram que os animais que consumiram a proteína da soja rica em isoflavonas (PSRI) desenvolveram lesões menos severas que os que consumiram a proteína pobre em isoflavonas (PSPI). Entretanto, estes últimos também demonstraram uma ação protetora da PSPI em relação aos controles, deixando a dúvida se esse efeito protetor refere-se ao residual de isoflavonas presente na PSPI ou à proteína da soja *per se*. Algumas pesquisas, utilizando proteínas da soja com diferentes concentrações de isoflavonas, têm verificado um efeito dose-dependente sobre o colesterol plasmático, LDL-colesterol e HDL-colesterol (Antony *et al.*, 1997 e Crouse *et al.*, 1999). Uma diminuição na absorção intestinal de colesterol e um aumento na excreção de ácidos biliares têm sido sugeridos como os possíveis mecanismos para os efeitos na redução de lipídeos da proteína da soja (Potter *et al.*, 1998; Sugano *et al.*, 1988). Um aumento no RNA mensageiro do receptor da LDL em células mononucleares (Baum *et al.*, 1998), assim como um aumento na atividade do receptor da LDL

(Lovati *et al.*, 1987), têm sido encontrados com o consumo da soja, sendo este efeito dose-dependente em relação à concentração de isoflavonas da proteína da soja. Balmir *et al.* (1996) verificaram que em ratos e hamsters, a proteína da soja e extratos de isoflavonas da soja reduzem o colesterol total e o colesterol da LDL, mas, não têm efeito no colesterol da HDL ou triglicerídeos. Já Hendrich *et al.* (2000) verificaram um aumento de 20 a 30 % no colesterol da HDL em hamsters fêmeas alimentadas com proteína da soja, em relação a outros grupos alimentados com caseína. O mecanismo para os efeitos no colesterol da HDL pode ser mediado pela interação das isoflavonas com os receptores estrogênicos (Potter *et al.*, 1998).

Outros estudos têm concluído que isoflavonas não são os componentes hipocolesterolêmicos da soja. Greaves *et al.* (1999) alimentaram macacas com proteína da soja ou dieta de caseína-lactalbumina, contendo ou não um extrato semipurificado de isoflavonas. O extrato semipurificado de isoflavonas adicionado à dieta de caseína-lactalbumina não teve o mesmo efeito sobre os níveis de colesterol plasmático e colesterol das frações VLDL, LDL e HDL que a proteína da soja intacta. Esses dados indicam que outros fatores presentes na soja também conferem efeitos benéficos sobre a hipercolesterolemia. Similarmente, Nestel *et al.* (1997) não encontraram efeito sobre o colesterol da LDL ou da HDL em mulheres pós-menopausa tomando tabletes de isoflavonas. Greaves *et al.* (2000) verificaram o efeito das isoflavonas adicionadas a uma dieta de caseína-lactalbumina e da proteína da soja intacta sobre o metabolismo intestinal de colesterol. O extrato de isoflavonas adicionado à dieta de caseína-lactalbumina não teve efeito na redução de lipídeos. Somente foi visto efeito da proteína da soja sobre a

diminuição da absorção de colesterol. Clarkson (2000) propõe que algum outro componente da proteína da soja seria necessário para o efeito hipocolesterolêmico das isoflavonas. Porém, os nossos resultados mostram que as isoflavonas isoladamente, adicionadas a uma dieta rica em caseína, são capazes de reduzir o colesterol da LDL e de aumentar o transporte reverso de colesterol (através da HDL) em coelhos.

O extrato utilizado no presente estudo mostrou-se livre de contaminantes que poderiam interferir nos resultados, tais como as saponinas, que têm comprovada ação hipocolesterolêmica (Petit *et al.*, 1995 e Morehouse *et al.*, 1999). Todo o procedimento utilizado para a extração de isoflavonas tem a vantagem de ser pouco nocivo aos animais, pois somente foi utilizado como solvente etanol, que é totalmente evaporado na secagem da ração. O extrato purificado mostrou-se biodisponível, pois as isoflavonas foram detectadas no plasma e na urina dos animais.

As isoflavonas glicosiladas (genistina e daidzina) não foram detectadas no plasma porque elas são hidrolisadas pelo ácido gástrico (Xu *et al.*, 1995) e/ou clivadas pela enzima β -glicosidase, cuja atividade intestinal é bastante elevada (Friend *et al.*, 1984), resultando em suas agliconas genisteína e daidzeína, respectivamente. As agliconas são mais biodisponíveis que as formas conjugadas (King *et al.*, 1996 e Huthchins *et al.*, 1995). No intestino distal ocorre a formação de metabólitos específicos pelas bactérias intestinais, incluindo diidroisoflavonas, desmetilangolesina, equol e 4-etil fenol (Kelly *et al.*, 1993). As agliconas e alguns metabólitos bacterianos são absorvidos no trato gastro-intestinal, sendo conjugadas com ácido glicurônico e sulfato (Griffiths & Barrow, 1972). Esses conjugados,

posteriormente, sofrem recirculação entero-hepática (Joanneau *et al.*, 1995).

A genisteína e seu glicosídeo são menos biodisponíveis que a daidzeína e sua forma glicosilada, pois, embora tenha sido administrado uma dose maior de genisteína e genistina (figura 16), as concentrações de daidzeína e daidzina foram maiores no plasma e na urina (figuras 17 e 18). A daidzeína é mais resistente que a genisteína ao metabolismo bacteriano em ratos (Griffiths & Smith, 1972) e em humanos (Xu *et al.*, 1995). Conseqüentemente, a daidzeína está presente em maiores concentrações no intestino por um longo período de tempo, sendo mais biodisponível que a genisteína.

As concentrações plasmáticas de genisteína, daidzeína e equol correlacionaram-se negativamente com a concentração de colesterol da VLDL e LDL. A concentração de equol correlacionou-se positivamente com o colesterol da HDL (Tabela 2). Estes resultados confirmam o efeito das isoflavonas na hipercolesterolemia. O equol tem potente atividade estrogênica (Benetts *et al.*, 1946) e parece influenciar o metabolismo da HDL (Samman *et al.*, 1999).

O perfil de hipercolesterolemia em resposta à dieta baseada em caseína é transiente (figuras 22, 23 e 24). A caseína aumenta a reabsorção de colesterol e conseqüentemente diminui a síntese de colesterol e a expressão de receptores para LDL, diminuindo a captação da LDL e promovendo uma hipercolesterolemia até o terceiro mês da dieta. Após esse período, o colesterol diminui, pois a síntese endógena está diminuída e a dieta utilizada é isenta de colesterol. Estes resultados são confirmados por estudos baseados em modelos dietéticos de hipercolesterolemia induzida pela presença de caseína (Sacono *et al.*, 1997 e Daley *et al.*, 1994-a).

O aumento do colesterol da VLDL poderia ser explicado pela formação da β -VLDL, partícula formada na aterosclerose induzida em coelhos, que tem uma densidade similar à da VLDL, porém é enriquecida com ésteres de colesterol (Ross *et al.*, 1977 e Thompson *et al.*, 1983). A β -VLDL é uma partícula aterogênica, promovendo acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos (Goldstein *et al.*, 1980) e adesão de monócitos a células endoteliais (Territo *et al.*, 1989). Alguns autores têm demonstrado aumento no colesterol da HDL (Terpstra *et al.*, 1981 e Bauer *et al.*, 1987), enquanto outros encontraram pequena mudança (Scholz *et al.*, 1982 e Harabek-Smith & Carrol, 1987), decorrente da dieta com caseína. Harabek-Smith *et al.* (1989) encontraram, ao final de 4 semanas da administração de uma dieta de caseína em coelhos, uma diminuição do colesterol da HDL associada com um aumento do colesterol da LDL.

Em ratos, tem sido verificado uma hipertrigliceridemia em resposta à dieta contendo caseína (Sugano *et al.*, 1982 e Cohn *et al.*, 1984). No entanto, em coelhos tem sido observada uma tendência à diminuição dos triglicerídeos (Kurowska *et al.*, 1989), o que pode ser resultado de uma mudança mais pronunciada no metabolismo da LDL. A presença de isoflavonas não afetou as concentrações de triglicerídeos. Os triglicerídeos tendem a diminuir particularmente em pessoas com hipertrigliceridemia que fazem uso da proteína da soja (Verrillo *et al.*, 1985; Grundy *et al.*, 1983).

Com relação às concentrações de proteína não foram observadas diferenças significativas importantes entre os grupos. Nenhum aumento nas concentrações de proteína da VLDL foi encontrado em coelhos, após 4 semanas de alimentação com uma dieta contendo 27% de caseína, em relação aos coelhos alimentados

com 27% de proteína da soja; porém, houve um aumento nas concentrações de proteína da LDL, assim como, diminuição nas da HDL (Harabek-Smith *et al.*, 1989).

Além dos efeitos verificados sobre o perfil lipídico, as isoflavonas têm mostrado importantes ações sobre a produção de óxido nítrico. Nitrato é o principal metabólito e produto final do metabolismo do óxido nítrico. Os níveis de nitrato plasmático são freqüentemente utilizados como índice da formação endógena de óxido nítrico pelo fato de aproximadamente 75% do óxido nítrico endógeno ser convertido a nitrato (Westfelt *et al.*, 1995).

Podemos verificar um aumento transiente do nitrato plasmático em ambos os grupos estudados (figura 36). Resultados semelhantes foram encontrados por Freyschuss *et al.* (1996), em coelhos tratados com uma dieta contendo 1% de colesterol, nos quais observou-se um aumento de nitrato plasmático entre 3 a 6 semanas de dieta, havendo posterior regressão aos níveis basais após a 9ª semana. Esse aumento transiente da concentração plasmática de nitrato poderia refletir um aumento da síntese de óxido nítrico no início do período experimental, no mesmo período em que os níveis de colesterol começaram a aumentar. A hipercolesterolemia induzida pela dieta rica em caseína poderia promover uma agressão endotelial capaz de provocar um distúrbio da síntese de óxido nítrico. O retorno dos níveis de nitrato aos níveis basais poderia ser explicado por uma posterior inativação do $\cdot\text{NO}$. Sabe-se que a hipercolesterolemia induz um aumento da produção do ânion superóxido (Harrison, 1992 e Ohara *et al.*, 1993), o que poderia facilitar a reação deste radical com o óxido nítrico, formando peroxinitrito, o que impediria uma adequada vasodilatação dependente do endotélio e promoveria a

oxidação de lipoproteínas, contribuindo para a formação da lesão aterosclerótica. Uma outra hipótese seria que, em baixas concentrações, a LDL oxidada age aumentando a produção de óxido nítrico e em altas concentrações, inibindo-a (Blair *et al.*, 1999). Portanto, no primeiro mês de suplementação com isoflavonas, quando a hipercolesterolemia apenas se iniciava, a concentração de LDL oxidada poderia ser baixa e à partir do segundo mês, essa concentração poderia aumentar (quando ocorre o pico da hipercolesterolemia), inibindo assim a síntese de óxido nítrico.

Recentemente, a localização da NOSe em invaginações especializadas da membrana plasmática, chamadas cavéolas, tem sido proposto como necessário para a máxima atividade da NOSe (Forstermann *et al.*, 1991; Boje & Fung, 1990). As cavéolas são altamente enriquecidas em colesterol. Várias evidências indicam que o aumento da regulação de caveolina (proteína presente nas cavéolas que interagem com NOSe), em células expostas a altos níveis de LDL-colesterol, resulta diretamente de um aumento na transcrição do gene da NOSe, induzido pelo maior conteúdo celular de colesterol (Bist *et al.*, 1997). Após 24 horas de exposição de células endoteliais à LDL-ox, observou-se um aumento na transcrição do RNA mensageiro da NOSc (Hirata *et al.*, 1995). Essas observações mostram que existe uma correlação entre produção de *NO e hipercolesterolemia e suportam a hipótese de que a alteração da vasodilatação dependente do endotélio, em vasos ateroscleróticos, pode não ser devida a uma diminuição da expressão da NOSc (Hirata *et al.*, 1995).

Minor *et al.* (1990) encontraram uma elevada produção de óxidos de nitrogênio em artérias ateroscleróticas de coelhos hipercolesterolêmicos, em relação a artérias normais e concluíram que

o impedimento do relaxamento dependente do endotélio na aterosclerose não é devido à menor atividade da enzima responsável pela produção de óxidos de nitrogênio à partir da arginina, ou da deficiência de arginina. A alteração da atividade vasodilatadora, induzida por dietas ricas em colesterol, pode resultar de uma menor incorporação de óxido nítrico em um composto com maior potencia vasodilatadora, ou à acelerada degradação do mesmo.

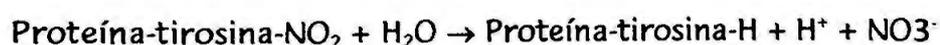
Behar-Roussel *et al.* (2000) induziram hipercolesterolemia em coelhos e não observaram diferença significativa na concentração de nitrato plasmático, em relação aos coelhos normocolesterolêmicos; porém, o nitrato excretado na urina pelos coelhos hipercolesterolêmicos foi significativamente maior. Böger *et al.* (1995) encontraram uma diminuição da excreção urinária de nitrato e do relaxamento dependente do endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos. Portanto, há várias contradições na literatura sobre a medida de nitrato e sua relação com a hipercolesterolemia. As medidas de nitrato plasmático e da excreção urinária de nitrato são parâmetros complexos que dependem da função renal e do volume plasmático, sendo também uma medida indireta da taxa de produção sistêmica de *NO . O *NO gerado no túbulo proximal pode também contribuir para a concentração plasmática e excreção urinária de nitrato porque há substancial reabsorção tubular de nitrato (Baylis e Vallance, 1998).

A concentração de nitrato do grupo que consumiu isoflavonas foi significativamente menor que o grupo controle. Estes resultados reforçam a hipótese de que as isoflavonas, em especial a genisteína, inibem a síntese de óxido nítrico por inibição das proteínas tirosina quinases (Sargeant *et al.*, 1993, Orlicek *et al.*, 1996). Esse resultado

é discordante de outros estudos que determinaram a atividade vasodilatadora da genisteína (Honoré *et al.*, 1997); porém, este efeito pode ter sido devido à atividade estrogênica das isoflavonas e não à ação do óxido nítrico *per se* (Crews and Khalil, 1999). A ação vasodilatadora do estrógeno pode ser devida a uma ação direta sobre o músculo liso (Barton, 1999), ou à redução da produção de superóxido (Barbacanne *et al.*, 1999), promovendo um aumento da biodisponibilidade do NO . Esta sugestão decorre do fato de que a ação vasodilatadora da genisteína só tem sido vista em fêmeas (Squadrito *et al.*, 2000; Honoré *et al.*, 1997). A possível diminuição da formação do óxido nítrico pelas isoflavonas pode ser benéfica no sentido de minimizar o estresse oxidativo decorrente da formação do peroxinitrito, o qual é um potente agente oxidante.

No presente trabalho, encontramos uma redução das concentrações plasmáticas de nitrato induzido pelas isoflavonas, assim como, um aumento das concentrações de nitrato da aorta. Essa contradição pode ser explicada pela presença das enzimas "nitratasas de proteínas" (Kuo *et al.*, 1999-a e b), que promovem a denitração de proteínas nitradas liberando nitrato (reação 1). Estas enzimas poderiam estar presentes em maior quantidade na aortas dos coelhos alimentados com isoflavonas. Um aumento da produção de nitrato e uma menor imunorreatividade a anticorpos anti-nitrotirosina sugerem a provável presença de enzimas de denitração (Kuo *et al.*, 1999-a e b). Esta denitração de proteínas pode ser crucial para regular a atividade enzimática e, portanto, minimizar a lesão oxidativa mediada por peroxinitrito.

Reação 1:



As propriedades antioxidantes das isoflavonas estão relacionadas com sua estrutura e aumentam em função do número de grupos hidroxila e da capacidade de doação de átomos de hidrogênio (Cao *et al.*, 1997). Compostos fenólicos podem inibir a nitração da tirosina por nitração preferencial, ou, atuar como doadores de elétrons (Pannala *et al.*, 1998). Isoflavonas têm similaridades estruturais com a tirosina em um dos seus anéis fenólicos e modificações de resíduos tirosina por oxidantes gerados na inflamação, tais como ácido hipocloroso (HClO) e peroxinitrito (ONOO⁻), têm sido descritas recentemente. As isoflavonas genisteína, daidzeína e biocianina A podem ser cloradas e nitradas por esses oxidantes (Boersma *et al.*, 1999). A habilidade das isoflavonas em reagir com essas espécies oxidantes depende de sua estrutura, sugerindo que tais reações poderiam acontecer sob condições específicas, nas quais essas espécies reativas são geradas sob condições patológicas. Portanto, seria esperado que os animais do grupo ISO expressassem menos NOSi e nitrotirosina em suas aortas, porém esse não foi o resultado obtido. O fato das análises imunohistoquímicas terem sido realizadas apenas com cortes do arco aórtico pode ter impedido que uma diferença maior entre os grupos tenha sido observada, em relação a essa variável, pois nesta região da aorta o “shear stress” é mais intenso, levando a uma maior expressão da NOSi e, conseqüente, maior formação de nitrotirosina (Posch *et al.*, 1999).

No nosso estudo detectamos a colocalização de NOSi e nitrotirosina nas artérias ateroscleróticas de coelhos (figura 38). Resultados semelhantes foram encontrados por Depre *et al.* (1999). Cromheeke *et al.* (1999) colocalizaram em carótidas humanas, NOSi,

nitrotirosina, mieloperoxidase e ceróide (material insolúvel composto de lipídeos oxidados, ácidos graxos poliinsaturados e proteínas presentes em lesões ateroscleróticas). Nitrotirosina e proteínas nitradas são consideradas sinais da formação e atividade de oxidantes derivados de $^{\bullet}\text{NO}$, através da formação de peroxinitrito, ou das reações catalisadas por mieloperoxidase (MPO). Luoma *et al.* (1998) colocaram NOSi, nitrotirosina e epítomos característicos da LDL oxidada. A colocação de NOSi e nitrotirosina indica que a NOSi é enzimaticamente ativa em artérias ateroscleróticas. A elevada formação de $^{\bullet}\text{NO}$ e superóxido, levando à formação de peroxinitrito, contribui para a peroxidação lipídica e para o estresse oxidativo, resultando em nitração de resíduos de tirosina de proteínas na aterosclerose.

NOSi e nitrotirosina estão presentes tanto na região da íntima quanto da média das artérias, associando-se com células musculares lisas (Brophy *et al.*, 2000). Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos por Buttery *et al.* (1996). Wilcox *et al.* (1997) detectaram uma baixa expressão de NOSi e nitrotirosina em células musculares lisas da média e da íntima. Uma coloração mais intensa, tanto para iNOS como para nitrotirosina, foi verificada no espaço subendotelial (figuras 38 e 39), correspondendo à área ocupada por lesões. Behr *et al.* (1999) associou a NOSi com macrófagos presentes em lesões ateroscleróticas e verificaram que quanto mais avançadas as lesões, mais intensa e difusa foi a expressão de NOSi, localizando-se tanto no espaço subendotelial como na camada média.

Pudemos ainda verificar que a dieta aterogênica baseada em caseína induz a expressão de HSPs na aorta de coelhos. HSP60, HSP70 e HSC70 estão aumentadas em lesões ateroscleróticas (Kol *et al.*,

1998; Johnson *et al.*, 1993, 1995 e Berberian *et al.*, 1990). As camadas íntima e média da carótida de ratos expostos a maior "shear stress" expressaram HSP60; nos animais controle não se observou a presença de HSP60 (Hochleitner *et al.*, 2000). A HSP70 e HSC70 estão localizadas em células musculares lisas e em macrófagos das lesões e funcionam como uma resposta celular a fatores de risco como hipercolesterolemia, hipertensão e modificação de fatores hemodinâmicos. Xu *et al.* (1996) imunizaram coelhos normais e hipercolesterolêmicos com HSP65 e verificaram a formação de lesões ateroscleróticas apenas pela imunização com HSP65. Porém, observou-se um aumento da expressão de HSP65 em lesões mais avançadas das artérias dos coelhos hipercolesterolêmicos. As lesões provocadas por HSP65 em coelhos normolipidêmicos regrediram, mas a dos coelhos hipercolesterolêmicos foram irreversíveis. No presente estudo, vimos uma correlação positiva entre a presença de HSPs e colesterol da LDL e uma correlação negativa entre HSPs e o colesterol da HDL (tabela 13). Estes resultados sugerem que o aumento da concentração de colesterol é um fator importante na indução de HSPs em artérias e que fatores que reduzam a concentração de colesterol, podem reduzir a expressão dessas proteínas. O extrato de isoflavonas, utilizado no nosso estudo, foi capaz de inibir a produção dessas proteínas.

As concentrações de nitrato plasmático correlacionaram-se com a expressão de HSP60 e HSC70 (tabela 13), confirmando que um possível aumento da síntese de $^{\circ}\text{NO}$ induz um aumento da expressão de HSPs. O aumento da síntese de $^{\circ}\text{NO}$ estimula a expressão de HSC70 em macrófagos e em células musculares lisas (Hirvonen, 1996). O $^{\circ}\text{NO}$ pode promover a S-nitrosilação de numerosas proteínas (Brunner *et al.*, 1996), por interação com um grupo sulfidríla livre, produzindo S-

nitrosotióis. O $\cdot\text{NO}$ pode atuar como agente oxidante da reação entre dois grupos tióis vicinais para formar uma ligação dissulfídica, produzindo modificações covalentes persistentes em proteínas (Ignarro, 1990). Tais modificações podem ocorrer em enzimas contendo centros ferro-enxofre, que são essenciais para a sobrevivência da célula. A ativação do HSF-1 (fator de choque térmico 1), induzida por $\cdot\text{NO}$, foi completamente bloqueada por DTT, um agente redutor de ligações dissulfeto (Xu *et al.*, 1997). As HSPs poderiam desempenhar um papel no reparo de proteínas desnaturadas modificadas pelo $\cdot\text{NO}$. A liberação de $\cdot\text{NO}$ da parede arterial, em resposta ao estresse hemodinâmico, pode ser, em parte, responsável pela produção da HSP70 em aortas (Johnson *et al.*, 1995). Similarmente, o aumento da expressão de HSPs em lesões ateroscleróticas pode também estar relacionado ao distúrbio da produção de $\cdot\text{NO}$ (Chen *et al.*, 1999; Bellman *et al.*, 2000). O $\cdot\text{NO}$ pode ser responsável pela inibição da peroxidação lipídica na LDL. A LDL oxidada pode atuar como um indutor para a expressão da HSP70 e HSC70 (Zhu, *et al.*, 1995 e Frostegard *et al.*, 1996). Assim, o envolvimento da expressão de HSPs diretamente com $\cdot\text{NO}$, ou com a LDL oxidada, é associado com a produção inapropriada de $\cdot\text{NO}$.

No presente estudo, a ingestão de isoflavonas reduziu a expressão dessas proteínas (tabelas 8 e 9). A genisteína é capaz de reduzir a expressão de HSPs em culturas de células (Zhou & Lee, 1998). Porém, ainda não se conhece nenhum estudo da modulação da expressão dessas proteínas *in vivo*. As isoflavonas podem reduzir a expressão de HSPs através de: 1) inibição de proteína tirosina quinases; 2) inibição da síntese de $\cdot\text{NO}$; 3) redução das concentrações séricas de colesterol e 4) redução da oxidação da LDL.

Provavelmente, por diminuírem a expressão das HSPs em artérias, as isoflavonas reduziram a resposta auto-imune mediada por essas proteínas e, conseqüentemente, os títulos de anticorpos séricos e a formação de complexos antígeno-anticorpo na aorta (figura 43). Além dos efeitos das isoflavonas verificados sobre a expressão das HSPs, as isoflavonas parecem modular várias funções imunológicas (Zhang *et al.*, 1997).

A resposta auto-imune mediada pelas HSPs contribui para a reação inflamatória presente no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A HSP70 parece não agir como auto-antígeno, o que não acontece para a HSC70 e a HSP60 (Jäätelä e Wissing, 1992). Pacientes com aterosclerose possuem altos títulos de anticorpos anti-HSP60/65 (Xu *et al.*, 1999). Anticorpos contra HSP60, HSP70 e HSC70 foram detectados no soro de pacientes com cardiomiopatia, em comparação com controles saudáveis (Portig *et al.*, 1997). Anticorpos anti-HSP60/65 reagem com HSP60 presente em altos níveis em lesões ateroscleróticas, principalmente em macrófagos e células endoteliais. Macrófagos expressando HSP60 podem ser lisados por autoanticorpos anti-HSP60/65, o que pode contribuir para a morte celular em placas ateroscleróticas *in vivo*. (Schett, *et al.*, 1997).

A dieta aterogênica, baseada em caseína, induziu a formação de lesões caracterizadas por numerosos macrófagos contendo alto teor de lipídeos (foam cells) (fig. 45). Alguns investigadores têm detectado que coelhos alimentados com caseína desenvolvem lesões aórticas com morfologias variáveis (Daley *et al.*, 1994-b). Honoré *et al.* (1997) alimentaram dois grupos de macacos, com aterosclerose pré-existente, com proteínas da soja contendo ou não isoflavonas. Não houve diferença na área de lesões ateroscleróticas entre os grupos. Uma

dieta aterogênica, contendo proteína da soja rica em isoflavonas, reduziu em 50 % a formação de lesões ateroscleróticas em camundongos, comparada com outro grupo que consumiu a dieta aterogênica contendo proteína da soja pobre em isoflavonas (Kirk *et al.*, 1998). Portanto, a ação das isoflavonas sobre a aterosclerose parece ser preventiva, não tendo resultados consistentes sobre a regressão de lesões. As isoflavonas tem mostrado propriedades antiproliferativas *in vitro* (Raines e Ross, 1995; Fotsis *et al.*, 1995), em particular, a genisteína, por inibir a proteína tirosina quinase.

Muitos fatores de crescimento influenciam a proliferação celular através de ligação a receptores de superfície celular, resultando em ativação de tirosina quinases, localizadas em domínios intracelulares dos receptores, e promovendo divisão celular. Meng *et al.* (1999) têm investigado se moléculas de isoflavonas podem ser transportadas para dentro das células para influenciar a proliferação celular. Estes autores mostraram que quantidades significantes de ésteres de ácidos graxos lipofílicos de isoflavonas podem ser incorporadas na LDL e que a LDL enriquecida com estes ésteres inibe significativamente a proliferação celular. Kaamanen *et al.* (2000) verificaram a formação desses derivados lipofílicos de isoflavonas no plasma, similarmente aos estrógenos (que possuem estrutura similar às isoflavonas) que estão presentes no plasma na forma esterificada (Hochberg *et al.*, 1998). Este achado é importante, tanto para explicar a ação das isoflavonas sobre a inibição da oxidação da LDL como para explicar a inibição da formação de lesões ateroscleróticas.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que as isoflavonas poderiam exercer efeitos benéficos, em relação ao desenvolvimento da aterosclerose, por promoverem redução do colesterol da LDL e da

aorta, aumento do transporte reverso de colesterol, devido ao aumento do HDL-colesterol, e diminuição da expressão das proteínas de choque térmico e da resposta auto-imune provocada por essas proteínas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As isoflavonas da soja, mesmo não associadas à proteína da soja, possuem efeito hipocolesterolêmico em coelhos, diminuindo os níveis de colesterol da LDL e elevando o colesterol da HDL.

A redução da concentração plasmática de nitrato, observada no grupo ISO, sugere que as isoflavonas promoveram uma redução da síntese de óxido nítrico. No entanto, estudos complementares devem ser realizados para confirmar esse resultado, uma vez que a detecção imunohistoquímica da óxido nítrico sintase e da nitrotirosina não mostrou diferenças entre os grupos.

As isoflavonas reduziram a produção de proteínas de choque térmico (HSP60, HSC70 e HSP70) no arco aórtico, assim como os títulos de anticorpos anti-HSP60, HSC70 e HSP70 no soro e no arco aórtico dos animais suplementados.

A hipercolesterolemia parece está associada com a produção de HSP60, HSC70 e HSP70 e a formação de autoanticorpos anti-HSP60, HSC70 e HSP70. A concentração de nitrato está correlacionado com a expressão das HSPs analisadas, podendo significar que uma maior produção de óxido nítrico esteja relacionada com um aumento da síntese dessas proteínas.

O efeito das isoflavonas sobre a hipercolesterolemia, o conteúdo aórtico de colesterol e as proteínas de choque térmico pode estar envolvido na diminuição da incidência, área e volume de lesões ateroscleróticas, em coelhos alimentados com uma dieta aterogênica contendo caseína, sugerindo um efeito benéfico das isoflavonas no desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

RESUMO E ABSTRACT

7. RESUMO

As isoflavonas da soja, em especial, a genisteína, atuam na sinalização intracelular inibindo as proteína tirosina quinases. Devido a este efeito, as isoflavonas podem modificar diversas vias metabólicas, incluindo a síntese de óxido nítrico ($^{\circ}\text{NO}$) e das proteínas de choque térmico, fatores importantes no desenvolvimento da aterosclerose. Com o objetivo de verificar a influência das isoflavonas da soja sobre a produção de proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70 e HSC70) e de $^{\circ}\text{NO}$ na aterosclerose experimental, alimentou-se um grupo de coelhos machos New Zealand com uma dieta aterogênica contendo 27% de caseína (CAS) e outro grupo com a mesma dieta suplementada com isoflavonas (5,1 mg/Kg/dia) purificadas da soja (ISO). Amostras de sangue foram coletadas mensalmente e, ao final de 6 meses, os animais foram sacrificados e as aortas foram retiradas para análise. O grupo ISO apresentou uma diminuição significativa do LDL-colesterol (36,2%) e do conteúdo de colesterol da aorta (36 %), além de um aumento do HDL-colesterol (2,1 vezes), em relação ao grupo CAS. A concentração plasmática de nitrato (metabólito do $^{\circ}\text{NO}$) e os níveis de anticorpos anti-HSP60, HSP70 and HSC70 no soro e na aorta foram significativamente menores no grupo ISO. A detecção de HSP60, HSP70 e HSC70 foi significativamente menor no grupo ISO. A detecção de NOSi ($^{\circ}\text{NO}$ sintase indutível) e nitrotirosina não mostrou diferenças entre os grupos. A suplementação com isoflavonas promoveu uma redução da área (40%) e do volume (35%) das lesões ateroscleróticas presentes na aorta. Portanto, as isoflavonas da soja, reduziram a hipercolesterolemia, a produção de HSPs e autoanticorpos anti-HSPs, além da área e do volume de lesões

ateroscleróticas, em coelhos alimentados com uma dieta aterogênica contendo caseína.

8. ABSTRACT

Soy isoflavones, mainly genistein, may modify cellular signalling and affect several metabolic pathways by inhibiting tyrosine protein kinases. Among these pathways, the synthesis of nitric oxide (*NO) and of heat shock proteins are important for atherosclerosis development. To investigate the influence of soy isoflavones on the production of *NO and heat shock proteins (HSP60, HSP70 and HSC70) in experimental atherosclerosis, one group of white New Zealand rabbits was fed an atherogenic diet containing 27% casein (CAS) and another group was fed the same diet supplemented with soy isoflavones (5,1 mg/Kg/dia) (ISO). Blood samples were obtained monthly and after six months of feeding the rabbits were sacrificed and the aortas were removed. The ISO group showed a significant reduction of cholesterol in LDL (36.2%) and in aorta (36.0%), as well as, an increase of HDL-cholesterol (2,1 times) in relation to the CAS group. The concentration of nitrate (*NO -derived metabolite) in blood plasma and the levels of autoantibodies against HSP-60, HSP-70 and HSC 70 in blood plasma and in aortic tissue were significantly decreased in the ISO group. No differences were found for iNOS (inducible *NO synthase) and nitrotyrosine between the studied groups. The isoflavone supplementations promoted a reduction of the area (40%) and volume (35%) of the aorta atherosclerotic lesions. Thus, soy isoflavones reduced the hypercholesterolemia, the production of HSPs and antibodies anti-HSPs, as well as, the atherosclerotic lesions in rabbits fed a casein-based atherogenic diet.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFEK, A., GEORGE, J., GILBURD, B., RAUOVA, L., GOLDBERG, I., KOPOLOVIC, J., HARATS, D., SHOENFELD, Y. Immunization of Low-Density Lipoprotein Receptor Deficient (LDL-RD) mice with Heat Shock Protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. *J. Autoimmun.*, v.14, p.115-121, 2000.
- ANDERSON, J.W., JOHNSTONE, B.M., COOK-NEWELL, M.E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *J. Med.*, Westbury, v.333, p.276-282, 1995.
- ANDERSON, J.W. Dietary fiber and diabetes. In: VAHOUNY, G.V., KRITCHEVSKY, D., eds. *Dietary fiber in health and disease*. New York: Plenum Press, 1982. v.151.
- ANDERSON, R.L., WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitor, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, n.3, p.581S-588S, 1995.
- ANITSCHKOW, N.N., CHALATOW, S. Uber experimentelle cholesterinsteatose and ihre bedeutung fur die entstehung einger pathologische prozesse. *Zentralbl. Allg. Pathol. Pathol. Anat.*, v.24, p.1-9, 1913.
- ANTHONY, M.S., CLARKSON, T.B., BULLOCK, B.C., WAGNER, J.D. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male Cynomolgus monkeys. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Baltimore, v.17, p.2524-2531, 1997.
- ANTHONY, M.S., CLARKSON, T.B., HUGLES, C.L., MORGAN, TM., BURKE, GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive sistem of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, p.43-50, 1996.
- ARNAL, J.F., MUNZEL, T., VENEMA, R.T., JAMES, N.L., BAI, C.L., MITCH, W.E., HARISSON, D.G. Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production: na effect independent of NO synthase substrate availability. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.95, p.2565-2572, 1995.

De acordo com a NBR6023/90 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1999 [CD-ROM].

- ASHTON, E.L., FOSTER, J.E., DALAIS, F.S., BALL, M.J. Effects of soy, as tofu, vs. meat on coronary heart disease risk factors: oral presentation abstracts. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.665S-678S, 2000.
- BALMIR, F., STAACK, R., JEFFREY, E., BERBER JIMENEZ, M.D., WANG, L., POTTER, S.M. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, p.3046-3053, 1996.
- BARBACANNE, M.A., RAMI, J., MICHEL, J.B., SOUCHARAD, J.P., PHILIPPE, M., BESOMBES, J.P., BAYARD, F., ARNAL, J.F. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium derived superoxide anion production. *Cardiovasc. Res.*, Amsterdam, v.41, p.21-32, 1999.
- BARTON, M. Vascular effects of estrogens: rapid actions, novel mechanisms, and potential therapeutic implications. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, v.20, p.682-690, 1999.
- BAUER, J.E. Serum lipoproteins of rabbits fed semipurified diets varying in protein and carbohydrate source. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.64, p.1183, 1987.
- BAUM, J.A., TENG, H., ERDMAN, J.W., WEIGEL, R.M., KLEIN, B.P., PERSKY, V.W., FREELS, S., SURYA, P., BAKHIT, R.M., RAMOS, E., SHAY, N.F., POTTER, S.M. Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell LDL receptor mRNA in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.68, p.545-551, 1998.
- BAYLIS, C., VALLANCE, P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine: what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*, v.7, p.59-62, 1998.
- BECKMAN, J.S., YE, Y.Z., ANDERSON, P.G., CHEN, J., ACCAVITTI, M.A., TARPEY, M.M., WHITE, C.R. Extensive nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.288, p.438-444, 1992.
- BECKMAN, J.S., YE, Y.Z., ANDERSON, P.G., CHEN, J., ACCAVITTI, M.A., TARPEY, M.M., WHITE, C.R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, Berlin, v.375, p.81-88, 1994.

- BEHR, D., RUPIN, A., FABIANI, J-N., VERBEUREN, T.J. Distribution and prevalence of inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic vessels of long-term cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, Berlin, v.142, p.335-344, 1999.
- BEHR-ROUSSEL, D., RUPIN, A., SIMONET, S., FABIANI, J-N., VERBEUREN, T.J. Urinary nitrate excretion in cholesterol-fed rabbits: effect of a chronic treatment by *N*-iminoethyl-L-lysine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v.388, p.275-279, 2000.
- BELLMANN, K., BURKART, V., BRUCKHOFF, J., KOLB, H., LANDRY, J. p38-dependent enhancement of cytokine-induced nitric-oxide synthase gene expression by heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.275, p.18172-9, 2000.
- BELLMANN, K., JAATTELA, M., WISSING, D., BURKART, V., KOLB, H. Heat shock protein hsp 70 overexpression confers resistance against nitric oxide *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.391, p.185-188, 1996.
- BENNETTS, H.W., UNDERWOOD, E.J., SHIER, F.L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, Collingwood, v.22, p.131-138, 1946.
- BERBERIAN, P.A., MYERS, W., TYTELL, M., CHALLA, V., BOND, M.G. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v.136, p.71-80, 1990.
- BEYNEN, A.C., VAN DER MEER, R., WEST, C.R. Mechanism of casein induced hypercholesterolemia: primary and secondary features. *Atherosclerosis*, Berlin, v.60, p.191-293, 1986.
- BICKOFF, E.M., LIVINGSTON, A.L., HENDRICKSON, A.P., BOOTH, N. Relative potencies of several oestrogen-like compounds in forages. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.10, p.410-412, 1962.
- BIST, A., FIELDING, P.E., FIELDING, C.J. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, p.94, n.20, p.10693-10698, 1997.
- BODE-BÖGER, S.M., BÖGER, R.H., KIENKE, S., JUNKER, W., FRÖLICH, J.C. Elevated L-arginine/dimethylarginin ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hipercholesterolemic rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.219, p.598-603, 1996.
-

- BOERSMA, B.J., PATEL, R.P., KIRK, M., JACKSON, PL., MUCCIO, D., DARLEY-USMAR, V.M., BARNES, S. Chlorination and nitration of soy isoflavones. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.368, p.265-275, 1999.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., MÜGE, A., KIENKE, S., BRANDE, R., DWENGER, A., FRÖLICH, J.C. Supplementation of hipocholesterolemics rabbits with L-arginine reduce the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis*, Berlin, v.117, p.273-284, 1995.
- BOJE, K.M., FUNG, H.L. Endothelial nitric oxide generating enzyme(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.253, p.20-26, 1990.
- BROPHY, C.M., KNOEPP, L., XIN, J., POLLOCK, J.S. Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.*, Bethesda, v.278, p.H991-H997, 2000.
- BRUNE, B.S., MOHR, S., MESSMER, U.K. Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.*, Berlin, v.127, p.1-30, 1996.
- BUCKLEY, A.R., BUCKLEY, D.J., GOUT, P.W., LIANG, H., RAO, Y.P., BLAKE, M.J. Inhibition by genistein of prolactin-induced Nb2 lymphoma cell mitogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, Amsterdam, v.98, n.1, p.17-25, 1993.
- BUTTERY, L.D.K., SPRINGALL D.R., CHESTER, A.H. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promote the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.*, Baltimore, v.75, p.77-85, 1996.
- CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.22, n.5, p.749-760, 1997.
- CARROL, K.K., KUROWSKA, E.M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animals and human studies. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, p.594S-597, 1995.
- CAYATTE, A.J., PALACINO, J.J., HORTEN, K., COHEN, R.A. Chronic inhibition fo nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hipercholesterolemics rabbits. *Arterioscler. Thromb.*, Dallas, v.14, p.753-759, 1994.
- CHAIT, A., BRUNZELL, J.D., DENKE, M.A. Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association: report of the Nutrition Committee. *Circulation*, Baltimore, v.88, p.3008-3029, 1993.
-

- CHEN, W., SYLDATH, U., BELLMANN, K., BURKART, V., KOLB, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol., Bethesda*, v.162, p.3212-3219, 1999.
- CHIN, J.H., AZHAR, S., HOFFMAM, B.B. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoprotein. *J. Clin. Invest., Ann Arbor*, v.89, p.10-18, 1992.
- CLARKSON, T.B. Are isoflavones the hypocholesterolemic components of soy protein?: oral presentation abstracts. *J. Nutr., Bethesda*, v.130, p.665S-678S, 2000.
- COHN, J.S., NESTEL, P.J. Hepatic lipoprotein receptor activity in rats fed casein and soy protein. *Atherosclerosis, Berlin*, v.56, p.247, 1985.
- COHN, J.S., KRIMPTON, W.G., NESTEL, P.J. The effect of dietary casein and soy protein on cholesterol and very low density lipoprotein metabolism in the rat. *Atherosclerosis, Berlin*, v.52, p.219, 1984.
- COOKE, J.P., ANDON, N.A., GIRERD, X.J., HIRSCH, A.T., CREAGER, M.A. Arginin restores cholinergic relaxation of hipercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation., Baltimore*, v.83, p.1057-1062, 1991.
- CREWS, J.K., KHALIL, R.A. Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry machanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., Carlton South*, v.26, n.9, p.707-715, 1999.
- CROMHEEKE, K.M., KOCKX, M.M., DE MEYER, G.R.Y., BOSMANS, J.M., BULT, H., BEELAERTS, W.J.F., VRINTS, C.J., HERMAN, A.G. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaque. *Cardiovasc. Res., Amsterdam*, v.43, p.744-754, 1999.
- CROUSE, J.R., MORGAN, T.M., TERRY, J.G., ELLIS, J., VITOLINS, M., BURKE, G.L. Arandomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med., Chicago*, v.159, p.2070-2076, 1999.
- DALEY, S.J., KLEMP, K.F., GUYTON, J.R., ROGERS, K.A. Cholestrol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part. 1: Differing lesion area and volume depite equal plasma cholestrol levels. *Arterioscler. Thromb., Dallas*, v.14, p.95-104, 1994a.
- DALEY, S.J., KLEMP, K.F., GUYTON, J.R., ROGERS, K.A. Cholestrol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. II. Differing morphological severity of
-

- atherosclerosis despite matched plasma cholesterol levels. *Arterioscler. Thromb., Dallas*, v.14, p.105-114, 1994b.
- DARLEY-USMAR, V.M., HOGG, N., O'LEARY, V.J., MONCADA, S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Commun., London*, v.17, p.9-20, 1992.
- DAUGHERTY, A., DUNN, J.L, RATERI, D.L., HEINECKE, J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest., Ann Arbor*, v.94, p.437-444, 1994.
- DEPRE, C., HAVAUX, X., RENKIN, J., VANOVERSCHELDE, J.L.J., WIJNS, W. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc. Res., Amsterdam*, v.41, p.465-472, 1999.
- DRAIJER, R., AT SMA, D.E., VAN DER LAARSE, A., VAN HINSBERG, V.W. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability: regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ. Res., Baltimore*, v.76, p.199-208, 1995.
- DUNCAN, A.M., MERZ, B.E., XU, X., NAGEL, T.C., PHIPPS, W.R., KURZER, M.S. Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab., Bethesda*, v.84, n.1, p.192-197, 1999.
- EISERICH, J.P., HRISTOVA, M., CROSS, C.E., JONES, A.D., FREEMAN, B.A., HALLIWELL, B. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature, London*, v.391, p.393-397, 1998.
- ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. *J. Agric. Food Chem., Columbus*, v.30, p.353-355, 1982.
- FAJANS, S.S., FLOYD JR., J.C., KNOPE, R.F., CONN, J.W. Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man. *Recent Progr. Horm. Res., Bethesda*, v.23, p.617-629, 1968.
- FARMAKADILIS, E., MURPHY, P.A. Isolation of 6''-O-Acetylgénistin and 6''-O-Acetyl daidzin from toasted defatted soyflakes. *J. Agric. Food Chem., Columbus*, v.33, p.385-389, 1985.
- FORSTERMANN, U., POLLOCK, J.S., SCHMIDT, H.H., HELLER, M., MURAD, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine

- aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.88, p.1788-1792,1991.
- FOTSIS, T, PEPPER, M., ADLERCREUTZ, H., HASE, T., MONTESANO, R., SCHWEIGERER, L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, p.790S-797S, 1995.
- FRANKE, A.A., CUSTER, L.J., TANAKA, Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.68, suppl., p.1466S-1473S, 1998.
- FREYSCHUSS, A., XIU, R-J., BENTHIN, G., HENRIKSSON, P., BJÖRKHEIM, I., WENNMALM, A. Dietary cholesterol induces transient changes in plasma nitrate levels in rabbits that are correlated to microcirculatory changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.221, p.107-110, 1996.
- FRIEND, D.R., CHANG, G.W. A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. *J. Med. Chem.*, Columbus, v.27, p.261-266, 1984.
- FRIES, D.M., PENHA, R.G., D'AMICO, E.A., ABDALLA, D.S.P., MONTEIRO, H.P. Oxized low density lipoprotein stimulates nitric oxide release by rabbit aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.207, n.1, p.231-237,1995.
- FROSTEGARD, J., KJELLMAN, B., GIDLUND, M., ANDERSON, B., JINDAL, S., KIESSLING, R. Induction of hest shok protein in monocytic cells by oxized low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, Berlin, v.121, p.93-103, 1996.
- FUHRMAN, B., BUCH, S., VAYA, J., BERLYNK, P.A., COLEMAN, R., HAYEK,T., AVIRAM, M. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: *in vitro* and *ex vivo* studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.66, n.2, p.267-275, 1997.
- FUKUTAKE, M., TAKAHASHI, M., KANAMURA, H., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem. Toxicol.*, Amsterdam, v.34, n.5, p.457-461, 1996.
- FURMAN, M.I., GRIGORYEV, D., BRAY, P.F., DISE, K.R., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J. Platelet tyrosine kinases and fibrinogen receptor activation. *Circ. Res.*, Baltimore, v.75, n.1, p.172-180, 1994.

- GHISELLI, G. Evidence that two synthetic pathways contribute to the apolipoprotein B pool of the low density lipoprotein fraction of rabbit plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.711, p.311-315, 1982.
- GIUGLIANO, D., MARFELLA, R., VERRAZZO, G., ACAMPORA, R., CAPPOLA, L., COZZOLINO, D., D'ONOFRIO, F. The vascular effects of L-arginine in humans: the roles of endogenous insulin. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.99, p.433-438, 1997.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta-very low density lipoproteins. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.255, p.1839-1848, 1980.
- GREAVES, K.A., PARKS, J.S., WILLIAMS, J.K., WAGNER, J.D. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized Cynomolgus monkeys. *J. Nutr.*, Bethesda, v.129, p.1585-1592, 1999.
- GREAVES, K.A., WILSON, M.D., RUDEL, L.L., WILLIAMS, J.K., WAGNER, J.D. Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with an isoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized Cynomolgus monkeys. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.820-826, 2000.
- GRIFFITHS, L.A., BARROW, A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem. J.*, Colchester, v.130, p.1161-1162, 1972.
- GRIFFITHS, L.A., SMITH, G.E. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. *Biochem. J.*, Colchester, v.128, p.901-911, 1972.
- GRUNDY, S.M., ABRAMS, J.J. Comparison of actions of soy protein and casein on metabolism of plasma lipoproteins and cholesterol in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.38, p.245-252, 1983.
- HAMILTON, R.M.G., CARROL, K.K. Effects of dietary proteins, carbohydrates and fibre from different sources. *Atherosclerosis*, Berlin, v.24, p.47-62, 1976.
- HARABEK-SMITH, J.M., CARROL, K.K. A comparative study of serum lipoproteins in rabbits fed a natural ingredient diet or low-fat, cholesterol-free, semipurified diets containing casein or isolated soy protein. *Biochem. Cell Biol.*, Ottawa, v.65, p.610, 1987.

- HARABEK-SMITH, J.M., KUROWSKA, E.M., CARROL, K.K. Effects of cholestrol-free, semipurified diets containing different levels of casein or soy protein on distribution of cholesterol and protein among serum lipoproteins of rabbits. *Atherosclerosis*, Berlin, v.76, p.125-130, 1989.
- HARRISON, D. In: VANE, J., HENDERSEN, A., eds. Nitric oxide nitrate therapy. Philadelphia: W.J. Harvey, 1992. p.35-37
- HAUSER, G.J., DAYAO, E.K., WASSERLOOS, K., PITT, B.R., WONG, H.R. HSP induction inhibits iNOS mRNA expression and attenuates hypotension in endotoxin-challenged rats. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.271, p.H2529-H2535, 1996.
- HAZEN, S.L., CROWLEY, J.R., MUELLER, D.M., HEINECKE, J.W. Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitivite and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.23, p.909-916, 1997.
- HAZEN, S.L., ZHANG, R., SHEN, Z., WU, W., PODREZ, E.A., MACPHERSON, J.C., SCHIMITT, D., MITRA, S.N., MUKHOPADHYAY, C., CHEN, Y., COHEN, P.A., HOFF, H.F., ABU-SOUD, H.M. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes. *Circ. Res.*, Baltimore, v.85, p.950-958, 1999.
- HENDRICH, S., SONG, T.T., OK LEE, S., MURPHY, P. Are saponins and/or other soybean components responsible for hypocholestrerolemic effects of soybean foods?: oral presentation abstracts. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.665S-678S, 2000.
- HIRATA, K., MIKI, N., KURODA, Y., SAKODA, T., KAWASHIMA, S., YOKOYAMA, M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.*, Baltimore, v.76, p.958-962, 1995.
- HIRVONEN, M.R., BRUNE, B., LAPETINA, E.G. Heat shock proteins and macrophage resistance to the toxic effects of nitric oxide. *Biochem. J.*, Colchester, v.315, p.845-849, 1996.
- HOCHBERG, R.B. Biological esterification of steroids. *Endocr. Rev.*, Bethesda, v.19, p.331-348, 1998.
- HOCHLEITNER, B.W., HOCHLEITNER, E.O., OBRIST, P., EBERL, T., AMBERGER, A., XU, Q., MARGREITER, R., WICK, G. Fluid shear stress induces heat shock protein 60

- expression in endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Baltimore, v.20, n.3, p.617-623, 2000.
- HONORÉ, E.K., WILLIAMS, J.K., ANTONY, M.S., CLARKSON, T.B. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v.67, p.148-154, 1997.
- HOPPICHLER, F., LECHLEITNER, M., TRAWEGER, C., SCHEIT, G., DZIEN, A., STURM, W., XU, Q. Changes of serum antibodies to heat shock protein 65 in coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, Berlin, v.126, n.2, p.333-338, 1996.
- HSU, J.T., YING, C., CHEN, C.J. Regulation of inducible nitric oxide synthase by dietary phytoestrogen in MCF-7 human mammary cancer cells. *Reprod., Nutr., Dev.*, Paris, v.40, n.1, p.11-18, 2000.
- HUFF, M.W., CARROL, K.K. Effects of dietary protein on turnover, oxidation and absorption of cholesterol and on steroid excretion in rabbits. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.21, p.546, 1980.
- HUFF, M.W., HAMILTON, R.M.G., CARROL, K.K. Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. *Atherosclerosis*, Berlin, v.28, p.187-195, 1977.
- HUIE, R.E., PADJAMA, S. The reaction of nitric oxide with organic peroxyl radicals. *Free Radical Res. Commun.*, London, v.18, p.195-199, 1993.
- HUTCHESON, I.R., SMITH, J.A., GRIFFITH, T.M. Abolition of flow-dependent EDRF release before that evoked by agonists in hypercholesterolemic rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, Basingstoke, v.113, p.190-194, 1994.
- HUTCHINS, A.M., SLAVIN, J.L., LAMPE, J.W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.95, p.545-551, 1995.
- IGNARRO, L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v.30, p.535-556, 1990.
- IGNATOWSKI, A.I. Influence de la nourriture animale sur l'organisme des lapins. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.*, v.20, p.1-10, 1908.
- JÄÄTTELÄ, M., WISSING, D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann. Med.*, Paris, v.24, p.249-259, 1992.
-

- JESSUP, W. Oxized lipoproteins and nitric oxide. *Curr. Opin. Lipidol.*, Hagerstown, v.7, p.247-280, 1996.
- JIANG, Q., HURST, J.K. Relative chlorinating, nitrating and oxidizing capabilities of neutrophil determined with phagocytosable probes. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.272, p.32767-32772, 1997.
- JOANNOU, G.E., KELLI, G.E., REEDER, A.Y., WARING, M.A., NELSON, C. A urinary profile study of dietary phytoestrogens: the identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.54, p.167-184, 1995.
- JOHNSON, A.D., BERBERIAN, P.A., TYTELL, M., BOND, G. Atherosclerosis alters the localization of HSP70 in human and macaque aortas. *Exp. Mol. Pathol.*, Orlando, v.58, p.155-168, 1993.
- JOHNSON, A.D., BERBERIAN, P.A., TYTELL, M., BOND, M.G. Differential distribution of 70-KD heat shock protein in atherosclerosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Baltimore, v.15, p.27-36, 1995.
- KAAMANEN, M., ADLERCREUTZ, H., TIKKANEN, M.J. The incorporation of isoflavone phytoestrogens in lipoproteins. *Atherosclerosis*, Berlin, v.151, n.1, p.17, 2000.
- KAPIOTIS, S., HERMANN, M., HELD, I., SEELOS, C., EHRINGER, H., GMEINER, B.M.K. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Baltimore, v.17, p.2868-2874, 1997.
- KAUFMANN, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today*, Amsterdam, v.11, p.129-136, 1990.
- KELLY, G.E., NELSON, C., WARING, M.A., JOANNOU, G.E., REEDER, A.Y. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin. Chim. Acta*, Shannon, v.223, p.9-22, 1993.
- KERRY, N., ABBEY, M. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis*, Berlin, v.140, p.341-347, 1998.
- KIESSLING, R., GRÖNBERG, A., IVANYI, J., SODERSTROM, K., FERM, M., KLEFFMAN, T., NILSSON, E., KLARESKOG, L. Role of hsp60 during autoimmune and bacterial inflammation. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v.12, p.91-111, 1991.
- KING, R.A., BROADBENT, J.L., HEAD, R.J. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, p.176-182, 1996.

- KIRK, E.A., SUTHERLAND, P., WANG, S.A., CHAIT, A., LEBOEUF, R.C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.*, Bethesda, v.128, p.954-959, 1998.
- KOL, A., LICHTMAN, A.H., FINBERG, R.W., LIBBY, P., KURT-JONES, E.A. Cutting edge: heat shock protein (HSP60) activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.*, Bethesda, v.164, p.13-17, 2000.
- KOL, A., SUKHOVA, A.H., LICHTMAN, A.H., LIBBY, P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*, Baltimore, v.98, p.300, 1998.
- KRITCHEVSKY, D., CZARNECKI, S.K. Influence of specific amino acids on experimental atherosclerosis in rabbits: oral presentation abstracts. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.665S-678S, 2000.
- KUGIYAMA, K., KERNS, S.A., MORRISETT, J.D., ROBERTS, R., HENRY, P.D. Impairment of endothelium-dependent arterial by lysolecithin in modified low density lipoproteins. *Nature*, London, v.344, p.160-162, 1990.
- KUIPER, G.G., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B., CORTON, J.C., SAFE, S.H., VAN DER SAAG, P.T., VAN DER BURG, B., GUSTAFSSON, J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, Tokyo, v.139, p.4252-4263, 1998.
- KUO, W.N., KANADIA, R.N., SHANBHAG, V.P. Denitration of peroxynitrite-treated proteins by "protein nitrates" from dog prostate. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, Basingstoke, v.47, n.6, p.1061-1067, 1999a.
- KUO, W.N., KANADIA, R.N.A., SHANBHAG, V.P., TORO, R. Denitration of peroxynitrite-treated proteins by "protein nitrates" from rat brain and heart. *Mol. Cell. Biochem.*, Dordrecht, v.201, p.11-16, 1999b.
- KUROWSKA, E.M., CARROL, K.K. Effect of high levels of selected dietary essential amino acids on hypercholesterolemia and down-regulation of hepatic LDL receptors in rabbits. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1126, p.185-191, 1992.
- KUROWSKA, E.M., CARROL, K.K. Hypercholesterolemic responses in rabbits to selected groups of essential amino acids. *J. Nutr.*, Bethesda, v.124, p.364-370, 1994.

- KUROWSKA, E.M., CARROLL, K.K. LDL versus apolipoprotein B responses to variable proportions of selected amino acids in semipurified diets fed to rabbits and in the media of HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.7, p.418-424, 1996.
- KUROWSKA, E.M., HRABEK-SMITH, J.M., CARROLL, K.K. Compositional changes in serum lipoproteins during developing hypercholesterolemia induced in rabbits by cholesterol-free, semipurified diets. *Atherosclerosis*, Berlin, v.78, n.2/3, p.159-165, 1989.
- LA VILLE, A., MOSHY, R., TURNER, P.R., MILLER, N.E., LEWIS, B. Inhibition of cholesterol synthesis reduces low-density-lipoprotein apoprotein B production without decreasing very-low-density-lipoprotein apoprotein B synthesis in rabbits. *Biochem. J.*, Colchester, v.219, n.1, p.321-323, 1984.
- LANCASTER, J.J.R. *Nitric oxide: principles and actions*. New Orleans: Academic Press, 1996. p.39-41.
- LANGER, T., NEUPERT, W. Heat shock proteins hsp60 e hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Berlin, v.167, p.3-30, 1991
- LASZLO, A. Regulation of the synthesis of heat-shock proteins in heat-resistant variants of chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.*, Charlottesville, v.116, p.427-441, 1988.
- LEVINE, G.N., KEANEY, I.F., VITA, J.Á. Cholesterol reduction in cardiovascular disease: clinical benefits and possible mechanisms. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.332, p.512-521, 1995.
- LINDER, M.C. *Nutritional biochemistry and metabolism: with clinical applications*. 2.ed. New York: Elsevier, 1991.
- LORRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, p.265-275, 1951.
- LOVATI, M.R., MANZONI, C., CANAVESI, A., SIRTORI, M., VACCARINO, V., MARCHI, M., GADDI, G., SIRTORI, C.R. Soybean protein diet increases low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.80, p.1498-1502, 1987.
- LUOMA, J.S., STRALIN, P., MARKLUND, S.L., HILTUNEN, T.P., SÄRKIOJA, T., YLÄHERTTUALA, S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Baltimore, v.18, p.157-167, 1998.
-

- MÄKELÄ, S., SAVOLAINEN, H., AAVIK, E., MYLLÄRNIEMI, M., STRAUSS, L., TASKINEN, E., GUSTAAFSSON, J-A°, HÄYRY, P. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrgen receptors α and β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v.96, p.7077-7082, 1999.
- MALYSHEV, I.Y., MALUGIN, A.V., GOLUBEVA, L.Y., ZENINA, T.A., MANUKHINA, E.B., MIKOYAN, V.D., VANIN, A.F. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett., Amsterdam*, v.391, n.1/2, p.21-23, 1996.
- MARUI, N., OFFERMAN, M.K., SWERLICK, R., KUNSCH, C., ROSEN, C.A., AHMAD, M., ALEXANDER, R.W., MELDFORD, R.M. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest., Ann Arbor*, v.92, p.1866-1874, 1993.
- MENG, Q.H., WÄHÄLÄ, K., ADLERCREUTZ, H., TIKKANEN, M.J. Antiproliferative efficacy of soy isoflavone phytoestrogens delivered by low density lipoprotein particles into cultured U937 cells. *Life Sci., New York*, v.65, p.1695-1705, 1999.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign*, v.48, p.91, 1971.
- MINOR, R.L., MYERS, P.R., GUERRA, R., BATES, J.N., HARRISON, D.G. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest., Ann Arbor*, v.86, p.2109-2116, 1990.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev., Bethesda*, v.43, p.109-142, 1991.
- MOREHOUSE, L.A., BANGERTER, F.W., DENINNO, M.P., INSKEEP, P.B., MCCARTHY, P.A., PETTINI, J.L., SAVOY, Y.E., SUGARMAN, E.D., WILKINS, R.W., WILSON, T. C., WOODY, H.A., ZACCARO, L.M., CHANDLER, C.E. Comparison of synthetic saponin cholesterol absorption inhibitors in rabbits: evidence for a non-stoichiometric, intestinal mechanism of action. *J. Lipid Res., Bethesda*, v.40, n.3, p.464-474, 1999.
- MURPHY, P.A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol., Chicago*, v.36, p.60-64, 1982.
- NAGATA, Y., ISHIKAWA, N., SUGANO, M. Studies as the mechanism of antihypercolesterolemic action of soy protein and soy protein type amino acid

- mixture in relationship to casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.112, p.1614, 1982.
- NAKASHIMA, S., KOIKE, T., NOZAWA, Y. Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A₂-mediated human platelet responses. *Mol. Pharmacol.*, Bethesda, v.39, n.4, p.475-480, 1991.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory products of mammalian cells. *FASEB J.*, Bethesda, v.6, p.3051-3064, 1992.
- NESTEL, P.J., YAMASHITA, T., SASAHARA, T., POMEROY, S., DART, A., KOMESAROFF, P., OWEN, A., ABBEY, M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Baltimore, v.17, p.3392-3398, 1997.
- NILSON, J., REGNSTROM, J., FROSTEGARD, J., STIKO, A. Lipid oxidation and atherosclerosis. *Herz*, Munich, v.17, n.5, p.263-269, 1992.
- OHARA, Y., PETERSON, T.E., HARRISON, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.91, p.2546-2551, 1993.
- OSHIMA, H., FRIENSEN, M., BROUET, I., BARTSCH, H. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Fund. Chem. Tox.*, v.28, p.647-652, 1990.
- ORLICEK, S.L., MEALS, E., ENGLISH, B.K. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on tumor necrosis factor and nitric oxide production by murine macrophages *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.174, n.3, p.638-642, 1996.
- PANASENKO, O.M., BRIVIBA, K., KLOTZ, L.O., SIES, H. Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.343, p.254-259, 1997.
- PANNALA, A.S., RAZAQ, R., HALLIWELL, B., SINGH, S., RICE-EVANS, C.A. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.24, n.4, p.594-606, 1998.
- PETIT, P.R., SAUVAIRE, Y.D., HILLAIRE-BUYS, D.M., LECONTE, O.M., BAISSAC, Y.G., PONSIN, G.R., RIBES, G.R. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids*, New York, v.60, n.10, p.674-680, 1995.

- PFEUFFER, M. Differences in the underlying mechanisms of cholesterol- and casein induced hypercholesterolemia in rabbits and rat. *Atherosclerosis*, Berlin, v.76, p.89-91, 1989.
- PODREZ, E.A., SCIMITT, D., HOFF, H.F., HAZEN, S.L. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.103, p.1547-1560, 1999.
- POMERANTZ, K.B., HAJJAR, D.P., LEVI, R., GROSS, S.S. Cholesterol enrichment of arterial smooth muscle cells upregulates cytokine-induced nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.191, p.103-109, 1993.
- PORTIG, I., PANKUWEIT, S., MAISCH, B. Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Sidcup, v.29, n.8, p.2245-2251, 1997.
- POSCH, K., SCHMIDT, K., GRAIER, W.F. Selective stimulation of L-arginine uptake contributes to shear stress-induced formation of nitric oxide. *Life Sci.*, New York, v.64, n.8, p.663-670, 1999.
- POTTER, S.M. Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr. Rev.*, Secaucus, v.56, p.231-235, 1998.
- POTTER, S.M. Soy protein and serum lipids. *Curr. Opin. Lipidol.*, Hagerstown, v.7, n.4, p.260-264, 1996.
- PRUMMEL, M.F., VAN PARENREN, Y., BAKKER, O., WIERSINGA, W.M. Anti-heat shock protein (hsp)72 antibodies are present in patients with Graves' disease (GD) and in smoking control subjects. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.110, n.2, p.292-295, 1997.
- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.288, p.481-487, 1991.
- RAINES, E.W., ROSS, R. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and potential impact of soy. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, suppl.3, p.624S-630S, 1995.
- RAO, A.U., SUNG, M.K. Saponins as anticarcinogens. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, n.3, p.717S-724S, 1995.
- REDEGELD, F.A., HEIJDR, B., KNIPPELS, M.C., GARSSSEN, J., NIJKAMP, F.P. Nitric oxide production by macrophages stimulated by antigen-binding T-cell factors. *Immunol. Lett.*, Shannon, v.57, n.1/3, p.147-149, 1997.

- ROBERTS, D.C.K., STALMACH, M.E., KHALIL, M.W., HUTCHINSON, J.C., CARROLL, K.K. Effects of dietary protein on composition and turnover of apoproteins in plasma lipoproteins of rabbits. *Can. J. Biochem.*, Ottawa, v.59, p.642-647, 1981.
- ROSS, A.C., ZILVERSMIT, D.B. Chylomicron remnant cholesteryl esteres as the major constituent of very low density lipoproteins in plasma of cholesterol-fed rabbits. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.18, p.169-181, 1977.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, London, v.362, p.801-809, 1993.
- RUETTEN, H., THIERMERMANN, C. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br. J. Pharmacol.*, Basingstoke, v.122, p.59-70, 1997.
- RUETTEN, H., THIEMERMANN, C., PERRETTI, M. Upregulation of ICAM-1 expression on J774.2 macrophages by endotoxin involves activation of NF-kappaB but not protein tyrosine kinase: comparison to induction of iNOS. *Mediators Inflammation*, Abingdon, v.8, n.2, p.77-84, 1999.
- RUIZ-LARREA, M.B., MOHAN, A.R., PAGANGA, G., MILLER, N.J., BOLWELL, G.P., RICE-EVANS, C.A. Antioxidante activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Res.*, Amsterdam, v.26, p.63-70, 1997.
- SAKONO, M., FUKUYAMA, T., NI, W.H., NAGAO, K., JU, H.R., SATO, M., SAKATA, N., IWAMOTO, H., IMAIZUMI, K. Comparison between dietary soybean protein and casein of the inhibiting effect on atherogenesis in the thoracic aorta of hypercholesterolemic (ExHC) rats treated with experimental hypervitamin D. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.61, n.3, p.514-519, 1997.
- SAMMAN, S., WALL, P.M.L., CHAN, G.S.M., SMITH, S.J., PETOCZ, P. The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis*, Berlin, v.147, p.277-283, 1999.
- SANTELL, R.C., CHANG, Y.C., NAIR, M.G., HELFERICH, W.G. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.127, p.263-269, 1997.
- SARGEANT, P., FARNDAL, R.W., SAGE, S.O. ADP- and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase

- inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in Fura-2-loaded human platelets. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.268, n.24, p.18151-18156, 1993.
- SAUTIER, C., DOUCET, C., FLAMENT, C., LEMONNIER, D. Effects of soy protein and saponins on serum, tissue and feces steroids in rat. *Atherosclerosis*, Berlin, v.34, n.3, p.233-241, 1979.
- SCARABOTTOLO, L., TREZZI, E., ROMA, P., CATABANO, A.L. Experimental hyperthyroidism modulates the expression of the low density lipoprotein receptor by liver. *Atherosclerosis*, Berlin, v.59, p.329, 1986.
- SCARIM, A.L., HEITMEIER, M.R., CORBETT, J.A. Heat shock inhibits cytokine-induced nitric oxide synthase expression by rat and human islets. *Endocrinology*, Bethesda, v.139, n.12, p.5050-5057, 1998.
- SCHEIBER, M.D., LIU, J.H., SUBBIAH, M.T.R., REBAR, R.W., SETCHELL, K.D.R. Dietary soy isoflavones favorably influence lipids and bone turnover in healthy postmenopausal women: oral presentation abstracts. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.665S-678S, 2000.
- SCHETT, G., METZLER, B., MAYR, M., AMBERGER, A., NIEDERWIESER, D., GUPTA, R.S., MIZZEN, L., XU, Q., WICK, G. Macrophage-lysis mediated by autoantibodies to heat shock protein 65/60. *Atherosclerosis*, Berlin, v.128, p.27-38, 1997.
- SCHOLZ, K.E., BEYNEN, A.C., WEST, C.E. Comparison between the hypercholesterolemia in rabbits induced by semipurified diets containing either cholesterol or casein. *Atherosclerosis*, Berlin, v.44, p.85, 1982.
- SHARMA, R.D. Effect of hydroxy acids on hypercholesterolemia in rats. *Atherosclerosis*, Berlin, v.37, n.3, p.463-469, 1980.
- SHIMIZU, H., TANIGUCHI, T., ISHIKAWA, Y., YKOYAMA, M. Effects of nitric oxide on cholesterol metabolism in macrophages. *Atherosclerosis*, Berlin, v.129, p.193-198, 1997.
- SILVA, E.L., CHANG, Y.H., MORIEL, P., MIARA, J., BARBOSA, D.S., ARÚJO, F.B., ABDALLA, D.S.P. Lipoprotein oxidation: implications to atherogenesis. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, v.47, n.5/6, p.376-384, 1995.
- SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D., SQUADRITO, G., SAITTA, A., CUCINOTTA, D., MINUTOLI, L., DEODATO, B., FERLITO, M., CAMPO, G.M., BOVA, A.P., CAPUTI, A. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovasc. Res.*, Amsterdam, v.45, p.454-462, 2000.

- STAMLER, J.S., SINGEL, D.J., LOSCALZO, J. Biochemistry of oxide nitric and its redox-activated forms. *Science*, Washington, v.258, n.5090, p.1898-1902, 1992.
- STROES, E.S., KOOMANS, H.Á., BRUIN, T.W., RABELINK, T.J. Vascular function in the forearm of hypercholesterolemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet*, London, v.346, p.467-471, 1995.
- SUGANO, M., TANAKA, K., IDE, T. Secretion of cholesterol, tryglicerid and apolipoprotein A-I by isolated perfused liver from rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixture. *J. Nutr.*, Bethesda, v.112, p.855-864, 1982.
- SUGANO, M., YAMADA, Y., YOSHIDA, K., HASHIMOTO, Y., MATSUO, T., KIMOTO, M. The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean proteins in rats. *Atherosclerosis*, Berlin, v.72, p.115-122, 1988.
- TERPSTRA, A.H.M., SANCHEZ-MUNIZ, F.J. Time course of the development of hypercholesterolemia in rabbits fed semipurified diets containing casein or soy protein. *Atherosclerosis*, Berlin, v.39, p.217, 1981.
- TERRITO, M.C., BERLINER, J.A., ALMANDA, L., RAMIREZ, R., FOLGEMAN, A.M. Beta-very low density lipoprotein pretreatment of endothelial monolayers increases monocyte adhesion. *Arteriosclerosis*, Dallas, v.9, p.824-828, 1989.
- TIKKANEN, M.J., WÄHÄLÄ, K., OJALA, S., VIHMA, V., ADLERCREUTZ, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resitence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washigton, v.95, p.3106-3110, 1998.
- THOMPSON, K.H., ZILVERSMIT, D.B. Plasma very low density lipoprotein (VLDL) in cholesterol-fed rabbits: chylomicron remnants or liver lipoproteins? *J. Nutr.*, Bethesda, v.113, p.2002-2010, 1983.
- VAHOUNY, G.V., ADAMSON, I., CHALCARZ, W., SATCHITHANANDAM, S., MUESING, R., KLURFELD, D.M., TEPPER, S.A., SANGHVI, A., KRITCHEVSKY, D. Effects of casein and soy lipoprotein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in the rat. *Atherosclerosis*, Berlin, v.56, p.127-137, 1985.
- VALLANCE, P., MONCADA, S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horizons*, v.1, n.1, p.77-86, 1993.
- VAN DER VLEIT, A., EISERICH, J.P., HALLIWELL, B., CROSS, C.E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.272, p.7617-7625, 1997.

- VERRILLO, A., DE TERESA, A., GIARRUSSO, P.C., LA ROCCA, S. Soybean protein diets in the management of type II hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, Berlin, v.54, p.321-331, 1985.
- WALTON, P.A., WENDLAND, M., SUBRAMANI, S., RACHUBINSKI, R.A., WELCH, W.J. Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J. Cell. Biol.*, New York, v.125, n.5, p.1037-1046, 1994.
- WANG, G., HUEI-JU., MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.44, p.2377-2383, 1996.
- WASHBURN, S., BURKE, G.L., MORGAN, T., ANTHONY, M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause*, v.6, p.7-13, 1999.
- WEI, H., WEI, L., FRENKEL, K., BOWEN, R., BARNES, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.20, n.1, p.1-12, 1993.
- WESTFELT, U.N., BENTHIN, G., LUNDIN, S., STENQVIST, O., WENNMALM, A.A. Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. *Br. J. Pharmacol.*, New York, v.114, n.8, p.1621-1624, 1995.
- WESTHUYZEN, J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: na update. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, Philadelphia, v.27, n.1, p.1-10, 1997.
- WEVER, R.M.F., LÜSCHER, T.F., COSENTINO, F., RABELINK, T.J. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, Baltimore, v.97, p.102-108, 1998.
- WICK, G., SCHETT, G., AMBERGER, A., KLEINDIENST, R., XU, Q. Is atherosclerosis na immunologically mediated disease? *Immunol. Today*, Amsterdam, v.16, n.1, p.27-33, 1995.
- WILCOX, J.N., SUBRAMANIAN, R.R., SUNDELL, C.L., TRACY, W.R., POLLOCK, J.S., HARRISON, D.G., MARSDEN, P.A. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, Baltimore, v.17, p.2479-2488, 1997.
- WILLIAMS, J.K., CLARKSON, T.B. Dietary soy isoflavones inhibit *in-vivo* constrictor responses of coronary arteries to collagen-induced platelet activation. *Coron. Artery Dis., Proc. A. N. Richards Symp.*, Baltimore, v.9, p.759-764, 1998.

- WILSON, R.B., MIDLTON, C.C., SUN, G.Y. Vitamin E antioxidants and lipid peroxidation in experimental atherosclerosis in rabbits. *J. Nutr.*, Bethesda, v.108, p.1858-1867, 1978.
- WONG, H.R., FINDER, K.W., PITT, B.R. Expression of iNOS in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells is inhibited by the heat shock response. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.269, p.L843-L848, 1995.
- XU, Q., DIETRICH, H., STEINER, H.J., GOWN, A.M., SCHOEL, B., MIKUZ, G., KAUFMANN, S.H., WICK, G. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler. Thromb.*, Dallas, v.12, n.7, p.789-799, 1992.
- XU, Q., HU, Y., KLEINDIENST, R., WICK, G. Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.100, n.5, p.1089-1097, 1997.
- XU, Q., KIECHL, S., MAYR, M., METZLER, B., EGGER, G., OBERHOLLENZER, F., WILLEIT, J., WICK, G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Circulation*, Baltimore, v.100, p.1169-1174, 1999.
- XU, Q., KLEINDIENST, R., SCHEFF, G., WAITZ, W., JINDAL, S., GUPTA, R.S., DIETRICH, H., WICK, G. Regression of arteriosclerotic lesions induced by immunization with heat shock protein 65-containing material in normocholesterolemic, but not hypercholesterolemic, rabbits. *Atherosclerosis*, Berlin, v.123, p.145-155, 1996.
- XU, Q., LUEF, G., WEIMMANN, S., GUPTA, R.S., WOLF, H., WICK, G. Staining of endothelial cells and macrophages in atherosclerotic lesions with human heat-shock protein-reactive antisera. *Arterioscler. Thromb.*, Dallas, v.13, n.12, p.1763-1769, 1993b
- XU, Q., SCHEFF, G., SEITZ, C.S., HU, Y., GUPTA, R.S., WICK, G. Surface staining and activity of heat shock protein 60 antibodies in stressed aortic endothelial cells. *Circ. Res.*, Baltimore, v.75, p.1078-1085, 1994.
- XU, Q., WILLEIT, J., MAROSI, M., KLEINDIENST, R., OBERHOLLENZER, F., KIECHL, S., STULNIG, T., LUEF, G., WICK, G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*, London, v.341, n.8840, p.255-259, 1993a.
- XU, X., HARRIS, K.S., WANG, H.J., MURPHY, P.A., HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, p.2307-2315, 1995.

- XU, X., WANG, H.J., MURPHY, P.A., COOK, L., HENDRICH, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J. Nutr.*, Bethesda, v.124, p.825-832, 1994.
- YOUNG, R.A., ELLIOTT, T.J. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell*, Cambridge, v.59, p.5-8, 1989.
- ZHANG, R., LI, Y., WANG, W. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.29, n.1, p.24-28, 1997.
- ZHOU, Y., LEE, A.S. Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J. Natl. Cancer Inst.*, Cary, v.90, n.5, p.381-388, 1998.
- ZHU, W.M., ROMA, P., PIRILLO, A., PELLEGATTA, F., CATAPANO, A.L. Oxidized LDL induce hsp70 expression in human smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.372, p.1-5, 1995.